

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Síntese de derivados de purina, análise SAR em *Saccharomyces cerevisiae* e
Candida albicans e rastreio fármaco-genómico em *Saccharomyces cerevisiae*

Marco Gabriel Novais Cruz

Marco Gabriel Novais Cruz

Síntese de derivados de purina, análise SAR
em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida
albicans* e rastreio fármaco-genómico em
Saccharomyces cerevisiae



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marco Gabriel Novais Cruz

Síntese de derivados de purina, análise SAR
em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida*
albicans e rastreio fármaco-genómico em
Saccharomyces cerevisiae

Tese de Mestrado
Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professora Doutora Maria Alice Carvalho
Professora Doutora Maria João Sousa

DECLARAÇÃO

Nome: Marco Gabriel Novais Cruz

Endereço eletrónico: marcogabrielcruz@gmail.com

Telefone: (+351) 939437667

Número do Bilhete de Identidade: 13462852

Título dissertação: Síntese de derivados de purina, análise SAR em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* e rastreio fármaco-genómico em *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientadores:

Professora Doutora Maria Alice Gonçalves Carvalho

Professora Doutora Maria João Marques Ferreira Sousa Moreira

Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado: Mestrado em Química Medicinal

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A
REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, 07 de novembro de 2013

Assinatura: _____

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Alice Carvalho por ter acreditado que seria capaz de realizar este projeto. Agradeço também toda a ajuda, disponibilidade e, sugestões que enriqueceram este trabalho. Gostaria também de agradecer todos os conhecimentos que me transmitiu nos últimos anos e que contribuíram para a minha formação.

À Professora Doutora Maria João Sousa pela confiança que depositou em mim e pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço também toda a simpatia, a disponibilidade constante e o apoio prestado na discussão dos resultados. Obrigado pela paciência no esclarecimento das minhas dúvidas e pelos conhecimentos que partilhou comigo que enriqueceram este trabalho e a minha formação.

À Elisa e à Vânia pela simpatia e constante disponibilidade na aquisição dos espectros de RMN e na realização das análises elementares.

À Dr.^a Susana por toda a simpatia, disponibilidade e ajuda na realização do rastreio fármaco-genómico.

Aos meus colegas da Micro I por me terem acolhido tão bem. Por toda a simpatia, alegria e boa disposição com que sempre me brindaram. Obrigado por toda a ajuda e por se lembrarem de mim apesar de não estar sempre no laboratório. Agradeço em particular à Tânia pela ajuda constante e pelos comentários e sugestões.

Aos meus amigos e à minha família, em especial aos meus pais e irmãs por estarem sempre presentes e pelo apoio, compreensão e boa disposição que me transmitem todos os dias. Obrigada por acreditarem que seria capaz de chegar até aqui!

À Cláudia, por estares sempre presente nos momentos mais complicados e nunca me deixares ir abaixo. Obrigado por toda a ajuda, paciência, alegria e carinho ao longo deste ano. Obrigado por todo o teu apoio e por acreditares sempre em mim.

Síntese de derivados de purina, análise SAR em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* e rastreio fármaco-genómico em *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

Anualmente, as doenças infecciosas são responsáveis por cerca de 15 milhões de mortes a nível mundial, entre as quais se incluem as infeções fúngicas. O aparecimento de estirpes multirresistentes tem contribuído para a necessidade de desenvolver novos compostos com atividade antifúngica.

Neste trabalho, 6-amino-2-(hidroxifenil) ou 2-(polihidroxifenil)-9-aryl-purinas foram sintetizadas por reação de 4-amidino-5-aminoimidazoles com aldeídos fenólicos. A purificação dos novos compostos por cromatografia em *flash* seca contribuiu para os baixos rendimentos. Adicionalmente, 6-amino-9-aryl-purinas com protão em C2 foram sintetizadas com elevados rendimentos.

A atividade antifúngica dos compostos foi avaliada em *Saccharomoryces cerevisiae* e *Candida albicans*. Foram identificados quatro derivados de purina com atividade contra *S. cerevisiae*. Os derivados de purina com morfolina ou piperidina em C6 e o substituinte 3,4,5-trihidroxifenilo em C2 revelaram ser os mais ativos (MIC = 25 µM). Os estudos SAR mostraram que a atividade depende dos substituintes presentes em C2 e C6 do anel de purina.

Baseado num rastreio fármaco-genómico utilizando uma coleção de mutantes de *S. cerevisiae* da Euroscarf, foram identificados 95 genes envolvidos na sensibilidade e 223 na resistência a um derivado de purina ativo. “Enrolamento e modificação de proteínas” foi a categoria funcional mais representada tanto nas estirpes resistentes como nas sensíveis. O vacúolo, o *budding*, a polaridade celular e a formação de filamentos também se encontram afetados pela presença do derivado de purina.

Synthesis of purine derivatives, SAR studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* and chemical genomic screen in *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Every year, approximately 15 million deaths worldwide are caused by infectious diseases, including fungal infections. The emergence of multidrug-resistant strains has increased the need for developed of new antifungal drugs.

In this work, 6-amino-2-hydroxyphenyl or 2-polihydroxyphenyl-9-arylpurines were synthesized by reaction of 4-amidino-5-aminoimidazoles with phenolic aldehydes. The purification of new compounds by dry flash chromatography led to the isolation of products in low yield. In addition, 6-amino-9-arylpurines with a proton in C2 were synthesized in high yields.

The compounds were screened for antifungal activity against *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. We identify four purine derivatives with activity against *S. cerevisiae*. The purine derivatives with morpholine or piperidine as the C6 substituents and 3,4,5-trihydroxyphenyl substituent in C2 were highly active against the yeast (MIC = 25 μ M). SAR studies show that activity depends on the substituents present in C2 and C6 of the purine core.

Based on chemical genomics screen with Euroscarf mutants collection of *S. cerevisiae*, we identified 95 genes involved in the sensitivity and 223 in the resistance of an active purine derivative. The main function category that showed sensitivity and resistance to the presence of purine derivative was "folding and modification of proteins". The vacuole, the budding, the cell polarity and the filament formation were also affected by the presence of purine derivative.

Índice

CAPÍTULO 1	1
1. Introdução	3
1.1. Bactérias e agentes antibacterianos	3
1.2. Fungos e agentes antifúngicos	10
1.3. Desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos	17
1.3.1. Purinas	17
1.3.2. Polifenóis	22
1.4. Referências bibliográficas	26
CAPÍTULO 2	33
2. Objetivos	35
CAPÍTULO 3	37
3. Síntese e caracterização de 6-amino-9-arilpurinas	39
3.1. Reagentes de partida	45
3.1.1. Síntese de imidato	45
3.1.2. Síntese de 5-amino-4-cianoimidazoles	46
3.1.3. Síntese de 4-amidino-5-aminoimidazoles	47
3.1.4. Caracterização analítica e espectroscópica de 4-amidino-5-aminoimidazole	48
3.1.4.1. Dados físicos e analíticos	48
3.1.4.2. Espectroscopia de infravermelho, ^1H e ^{13}C RMN	48
3.2. 6-amino-9-arilpurinas	50
3.2.1. Síntese de 6-amino-2,9-diarilpurinas	50
3.2.2. Mecanismo da reação	57
3.2.3. Síntese de 6-amino-9-arilpurinas com protão em C_2	59
3.2.4. Caracterização analítica e espectroscópica de 6-amino-9-arilpurinas	60
3.2.4.1. Dados físicos e analíticos	60
3.2.4.2. Espectroscopia de infravermelho	60
3.2.4.3. Espectroscopia de ^1H RMN	60
3.2.4.4. Espectroscopia de ^{13}C RMN	67

3.3. Referências bibliográficas	79
CAPÍTULO 4	83
4. Atividade antifúngica de 6-amino-9-arilpurinas	85
4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
4.2. <i>Candida albicans</i>	91
4.3. Referências bibliográficas	94
CAPÍTULO 5	95
5. Rastreo fármaco-genómico com o composto 45f	97
5.1. Otimização das condições experimentais	98
5.2. Identificação de estirpes mutantes sensíveis e resistentes em resposta ao composto 45f	99
5.3. Identificação das categorias funcionais enriquecidas significativamente na resposta ao composto 45f	102
5.4. Referências bibliográficas	107
CAPÍTULO 6	109
6. Conclusões e perspectivas futuras	111
CAPÍTULO 7	113
7. Materiais e métodos	115
7.1. Instrumentação e reagentes	115
7.2. Procedimento experimental para a síntese dos compostos	116
7.2.1. Síntese de 4-amidino-5-aminoimidazoles	116
7.2.2. Síntese de 6-amino-9-arilpurinas	116
7.2.2.1. Derivados fenólicos	116
7.2.2.2. Derivados não fenólicos	121
7.3. Procedimento experimental para a avaliação da atividade antifúngica dos compostos	122
7.3.1. Preparação das soluções dos compostos	122
7.3.2. Determinação da atividade antifúngica dos compostos	123
7.3.3. Avaliação da viabilidade celular	123
7.4. Rastreo fármaco-genómico de uma coleção de mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> da Euroscarf	124

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Nome completo
ATP	Trifosfato de adenosina (acrónimo do inglês <i>Adenosine triphosphate</i>)
BOP	1- <i>H</i> -benzotriazole-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfónio hexafluorofosfato
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina (acrónimo do inglês <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina (acrónimo do inglês <i>Cyclic guanosine monophosphate</i>)
CLSI	Acrónimo do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Comp.	Composto
d	Duplete (nas descrições dos espectros de ^1H RMN)
dd	Duplete de dupletos (nas descrições dos espectros de ^1H RMN)
DAMN	Diaminomaleonitrilo
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	Diclorometano
DHP	Dihidropurina
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DMSO- d_6	Sulfóxido de dimetilo deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico (acrónimo do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade óptica
dt	Duplete de tripletos (nas descrições dos espectros de ^1H RMN)
eq.	Equivalente
f	Fraco (nas descrições dos espectros de IV)

GTP	Trifosfato de guanosina (acrónimo do inglês <i>Guanosine triphosphate</i>)
h	Horas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (acrónimo do inglês <i>Human immunodeficiency vírus</i>)
HMBC	Acrónimo do inglês <i>Heteroatom Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	Acrónimo do inglês <i>Heteroatom Multiple Quantum Correlation</i>
<i>i</i>	<i>Ipso</i>
i	Intenso (nas descrições dos espectros de IV)
IV	Infravermelho
l	Largo (nas descrições dos espectros de IV e de ¹³ C RMN)
<i>m</i>	<i>Meta</i>
m	Médio (nas descrições dos espectros de IV)
m	Multipeto (nas descrições dos espectros de ¹ H RMN)
MIC	Concentração mínima inibitória (acrónimo do inglês <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)-propanossulfónico
mRNA	RNA mensageiro
NAM	Ácido <i>N</i> -acetilmurâmico
<i>o</i>	<i>Orto</i>
<i>p</i>	<i>Para</i>
p.f.	Ponto de fusão
Rad.	Radiação
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (acrónimo do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
s	Singlete (nas descrições dos espectros de ¹ H RMN)
SAR	Relação estrutura-atividade (acrónimo do inglês <i>Structure-Activity Relationship</i>)
sl	Singlete largo (nas descrições dos espectros de ¹ H RMN)
t	Triplete (nas descrições dos espectros de ¹ H RMN)

t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoracético (acrónimo do inglês <i>Trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina (acrónimo do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i>)
UFC	Unidade formadora de colónias

Lista de figuras

Figura 1.1. Representação de uma célula procariótica, com as estruturas tipicamente presentes numa célula de bactéria.	4
Figura 1.2. Principais alvos e mecanismos de ação dos agentes antibacterianos.	5
Figura 1.3. Biossíntese da parede celular das bactérias e, mecanismo da ação da bacitracina 4 , D-cicloserina 5 , e vancomicina 6 .	6
Figura 1.4. Inibição do processo de tradução do mRNA pelo ribossoma bacteriano, resultando na inibição da síntese proteica.	7
Figura 1.5. Estruturas dos principais agentes antibacterianos.	8
Figura 1.6. Mecanismo de ação das sulfonamidas e da trimetoprima.	9
Figura 1.7. Linha temporal da descoberta de alguns agentes antibacterianos e da observação de resistência aos mesmos.	10
Figura 1.8. Linha temporal do desenvolvimento dos principais antifúngicos.	12
Figura 1.9. Mecanismo de ação dos principais agentes antifúngicos.	13
Figura 1.10. Estruturas dos principais agentes antifúngicos.	14
Figura 1.11. Mecanismos responsáveis pela resistência dos fungos aos fármacos.	16
Figura 1.12. Representação do núcleo de purina, com a respetiva numeração.	17
Figura 1.13. Potenciais aplicações dos derivados de purina.	18
Figura 1.14. Estrutura de derivados de purina com potenciais aplicações biológicas.	20
Figura 1.15. Estruturas de derivados de purina com atividade antimicrobiana.	21
Figura 1.16. Estruturas dos principais compostos fenólicos mais simples e ácidos fenólicos.	22
Figura 1.17. Representação do núcleo dos flavonóides.	23
Figura 1.18. Estrutura do núcleo dos flavanóis.	23
Figura 1.19. Estrutura do núcleo dos flavonóis.	24

Figura 1.20. Estrutura do núcleo da flavona e da flavonona.	24
Figura 2.1. Estrutura dos derivados de purina estudados.	36
Figura 3.1. Interação pela técnica bidimensional de HMBC do próton H ₂ com os carbonos 4 e 5, para o imidazole 59c .	50
Figura 3.2. Estrutura do contaminante formado na reação dos imidazoles 59 com os aldeídos fenólicos.	52
Figura 3.3. Estrutura proposta para os dois tautómeros presentes na amostra do composto 45r .	56
Figura 3.4. Ponte de hidrogénio intramolecular para as 6-amino-2,9-diarilpurinas, formada entre o próton do grupo hidroxilo na posição orto e o N ₁ ou N ₃ .	67
Figura 3.5. Interação pela técnica bidimensional de HMBC dos prótons das 6-amino-9-aryl purinas 45 e 62 com os carbonos vizinhos.	73
Figura 4.1. Atividade antifúngica dos compostos 62a (A), 45e (B), 45f (C) e 45l (D) contra <i>S. cerevisiae</i> , a diferentes concentrações.	88
Figura 4.2. Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> após 48h de incubação com diferentes concentrações (50 – 400 µM) do composto 45e .	89
Figura 4.3. Atividade antifúngica do fluconazole 17 (A) e flucitosina 23 (B) contra <i>S. cerevisiae</i> , a diferentes concentrações.	90
Figura 4.4. Atividade antifúngica do fluconazole 17 (A) e flucitosina 23 (B) contra <i>C. albicans</i> , a diferentes concentrações.	93
Figura 5.1. Categorias funcionais identificadas envolvidas na sensibilidade e resistência ao composto 45f .	101
Figura 5.2. Estruturas dos derivados de purina 65 e 66 .	103
Figura 7.1. Esquema do procedimento utilizado para o rastreio fármaco-genómico com uma coleção de mutantes da Euroscarf para identificar os genes de <i>S. cerevisiae</i> envolvidos na resistência e na sensibilidade ao composto 45f .	

Lista de tabelas

Tabela 3.1. Dados físicos e analíticos para o composto 59c .	48
Tabela 3.2. Dados espectroscópicos de IV (Nujol/cm ⁻¹), de ¹ H RMN (300 MHz, DMSO-d ₆) e ¹³ C RMN (75 MHz, DMSO-d ₆) para o composto 59c .	49
Tabela 3.3. Proporção relativa entre os dois produtos obtidos (45:62).	53
Tabela 3.4. Dados físicos e analíticos para os compostos 45 e 62 .	61
Tabela 3.5. Dados espectroscópicos de IV (Nujol/cm ⁻¹) para os compostos 45 e 62 .	64
Tabela 3.6. Dados espectroscópicos de ¹ H RMN (300 ^a) ou 400 ^b) MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 45 e 62 .	68
Tabela 3.7. Dados espectroscópicos de ¹³ C RMN (75 ^a) e 100 ^b) MHz, DMSO-d ₆) dos compostos 45 e 62 .	74
Tabela 4.1. Valores de MIC (μM) para as 6-amino-9-arilpurinas 45 e 62 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC4072.	87
Tabela 4.2. Valores de MIC (μM) para as 6-amino-9-arilpurinas 45g-1 e 62b em <i>Candida albicans</i> SC 5314.	92
Tabela 5.1. Categorias funcionais significativamente enriquecidas (valor de <i>p</i> inferior a 0,01) que se baseiam na identificação dos genes cuja deleção provoca um aumento da sensibilidade ao composto 45f .	104
Tabela 5.2. Categorias funcionais significativamente enriquecidas (valor de <i>p</i> inferior a 0,01) que se baseiam na identificação dos genes cuja deleção provoca um aumento da resistência ao composto 45f .	106

Lista de esquemas

Esquema 3.1. Síntese das 2-arilpurinas 47 por reação da 2-cloropurina 46 com diferentes ácidos borónicos.	40
Esquema 3.2. Reação de funcionalização da posição 6 do anel de purina.	41
Esquema 3.3. Reação da 6-cloropurina 50 com várias aminas, para gerar as 6-aminopurinas 51 .	41
Esquema 3.4. Síntese das 9-arilpurinas 53 através da reação da 2,6-dicloropurina 52 com diferentes ácidos borónicos.	42
Esquema 3.5. Reação da 2,6-dicloropurina 52 com diferentes ácidos borónicos, utilizando a 1,10-fenantrolina como base.	43
Esquema 3.6. Reação dos imidazoles 54 com vários aldeídos fenólicos, para originar as purinas 55 .	44
Esquema 3.7. Abordagem sintética utilizada para a síntese dos compostos 45 .	45
Esquema 3.8. Reação do DAMN com o ortoformiato de etilo, para a obtenção do imidato 56 .	45
Esquema 3.9. Reação do imidato 56 com a anilina, com catálise ácida.	46
Esquema 3.10. Reação do imidazole 58a com aminas secundárias.	47
Esquema 3.11. Reação dos imidazoles 59a e 59c com diferentes aldeídos fenólicos.	51
Esquema 3.12. Proposta mecanística para a reação dos imidazoles 59 com aldeídos fenólicos.	58
Esquema 3.13. Reação dos imidazoles 59 com <i>N,N</i> -dimetilformamida dietil acetal.	59

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

As doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos, como bactérias, fungos, vírus, parasitas ou ainda por priões.¹ Até ao ano 2000, foram identificadas 1415 espécies patogênicas para o Homem, entre as quais 538 são bactérias, 217 vírus e 307 fungos.² As doenças infecciosas podem ser transmitidas pelo contacto direto entre as pessoas ou pela picada de insetos/animais ou ainda pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Embora, algumas doenças infecciosas possam ser prevenidas pela vacinação, estas continuam a ser uma das principais causas de morte, especialmente em países em desenvolvimento.¹ Segundo a Organização Mundial de Saúde, anualmente morrem cerca de 15 milhões de pessoas devido a doenças infecciosas, sendo que entre as principais causas encontram-se as infeções respiratórias, a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a tuberculose.³

Atualmente, existem diversos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas. Entre esses incluem-se os antibacterianos e os antifúngicos que podem ser classificados como bacteriostáticos ou fungistáticos, se forem capazes de inibir o crescimento celular do microrganismo. Por outro lado, compostos que provocam a morte dos microrganismos são classificados como bactericidas ou fungicidas.⁴

1.1. Bactérias e agentes antibacterianos

As bactérias são seres unicelulares, com tamanho que varia entre 0,2 a 2 μm de diâmetro e 2 a 6 μm de comprimento (Figura 1.1) e, podem apresentar diversas formas: esféricas, alongadas e em espiral. Ao contrário das células eucariontes, as bactérias não possuem invólucro nuclear e, a região que contém o DNA é denominada nucleóide. Além disso, as bactérias possuem plasmídeos e ribossomas 70S, mas não possuem organelos como as células eucariontes. Por outro lado, as bactérias possuem parede celular, composta por peptidoglicano, proteínas, glicoproteínas e outros polissacarídeos.⁴

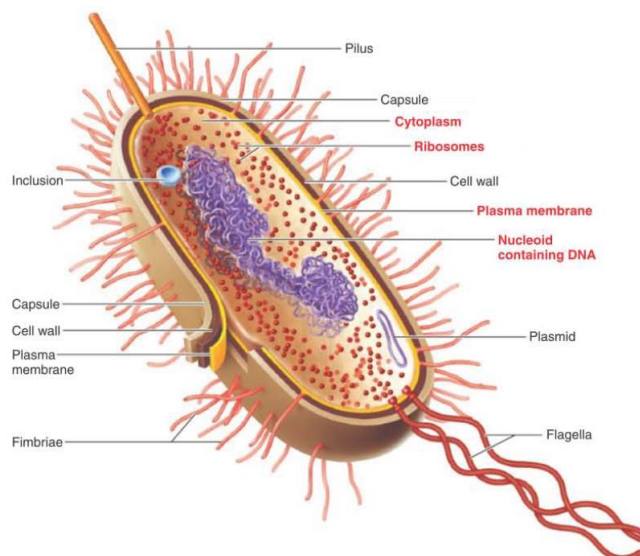


Figura 1.1. Representação de uma célula procariótica, com as estruturas tipicamente presentes numa célula de bactéria. As estruturas marcadas a vermelho estão presentes em todas as bactérias. Adaptado de ⁴.

A descoberta do primeiro antibacteriano remonta a 1928, quando Alexander Flemming observou que o fungo *Penicillium notatum* provocava a lise de colónias de estafilococos.⁵ Em meados dos anos 30, verificou-se que a penicilina era responsável pelo efeito observado. Entre 1940-1960, novas classes de antibacterianos foram descobertas, num período denominado “idade de ouro dos antibióticos”.⁴ Porém, nos últimos 40 anos, foram apenas desenvolvidos dois novos antibacterianos com interesse clínico, a daptomicina **1** e a linezolida **2**.⁶

Os agentes antibacterianos disponíveis atualmente podem ser de largo espectro de ação, isto é ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ou de espectro de ação estreito, ou seja, ativos apenas contra um dos tipos de bactérias.⁷ Os principais agentes antibacterianos e os respetivos alvos encontram-se sumariados na figura 1.2.⁸

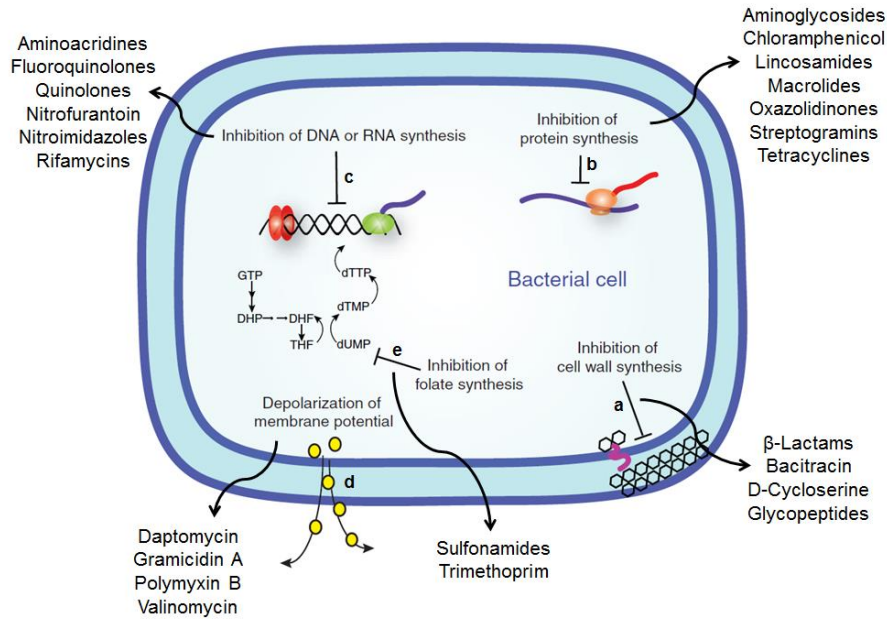


Figura 1.2. Principais alvos e mecanismos de ação dos agentes antibacterianos. Os principais agentes antibacterianos atuam pela inibição da síntese da parede celular (a), pela inibição da síntese proteica (b), pela inibição da síntese do DNA ou RNA (c), pela dissipação do potencial de membrana (d) e pela inibição da síntese do ácido fólico (e). Adaptado de ⁸.

Existem vários fármacos com atividade antibacteriana que têm como alvo a inibição da biossíntese da parede celular (Figura 1.2a).⁸ No entanto, estes atuam em diferentes etapas da biossíntese do peptidoglicano.⁷ A classe das β -lactamas, na qual se inclui as penicilinas **3**, impede a biossíntese do peptidoglicano pela inibição da transpeptidase, enzima responsável pela formação da ligação cruzada no peptidoglicano.⁹ Por outro lado, a bacitracina **4**, a D-cicloserina **5** e os glicopéptidos, nomeadamente a vancomicina **6**, atuam em diferentes etapas da biossíntese da parede celular, como está representado na figura 1.3.⁷

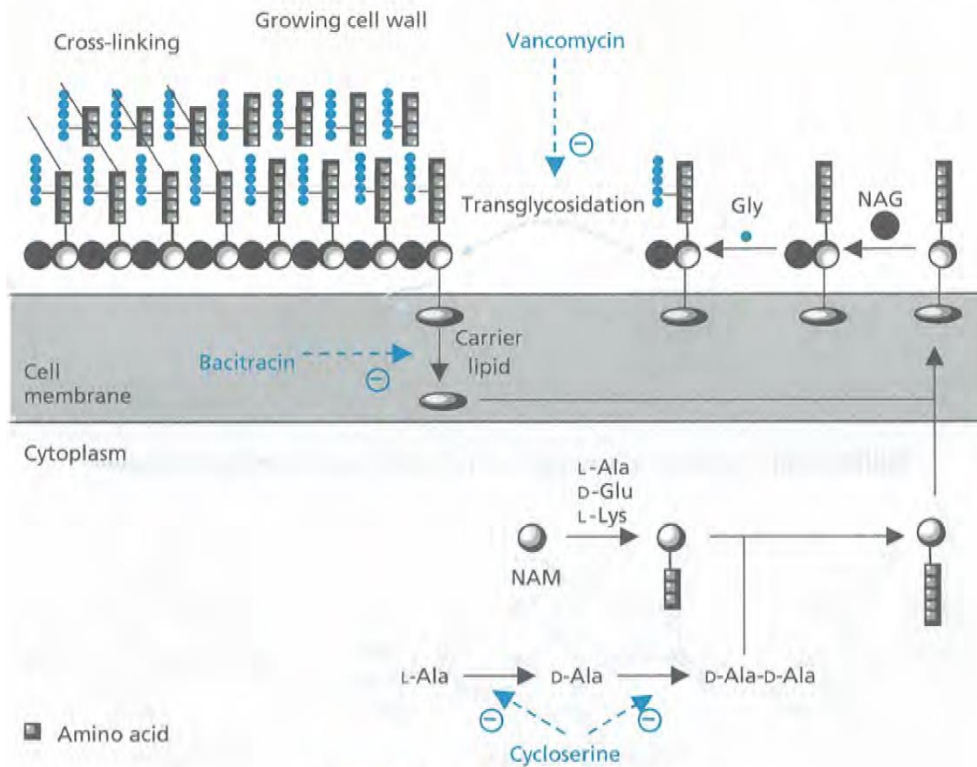


Figura 1.3. Biossíntese da parede celular das bactérias e, mecanismo da ação da bacitracina 4, D-cicloserina 5, e vancomicina 6. A bacitracina 4 liga-se ao transportador lipídico do NAM-pentapéptido, impedindo o seu transporte; a D-cicloserina 5 impede a formação do composto D-Ala-D-Ala através da inibição da L-alanina racemase e da D-Ala-D-Ala ligase; a vancomicina 6 liga-se às unidades constituintes da parede celular, provocando um impedimento estereoquímico, bloqueando o acesso da transglicosidase.⁷

Atualmente, existem diversos fármacos que têm como alvo a inibição da síntese proteica (Figura 1.2b).⁸ Na figura 1.4, encontram-se os diferentes processos afetados por alguns fármacos. Adicionalmente, as lincosamidas, como a lincomicina 7, e as estreptograminas têm propriedades antibacterianas e o modo de ação é idêntico ao dos macrólidos, uma vez que inibem a translocação ribossomal pela ligação à subunidade 50S dos ribossomas bacterianos.⁷

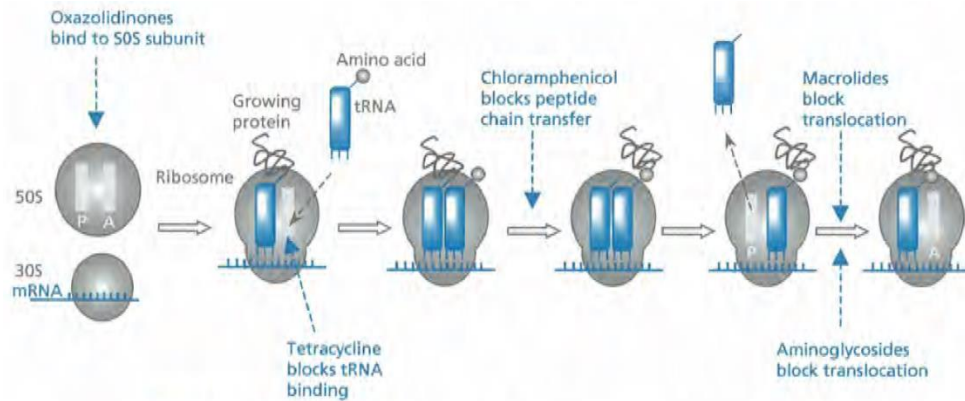


Figura 1.4. Inibição do processo de tradução do mRNA pelo ribossoma bacteriano, resultando na inibição da síntese proteica.⁷

A inibição da biossíntese do DNA ou RNA constitui um alvo terapêutico bastante importante (Figura 1.2c).⁸ As rifamicinas **8**, a nitrofurantoína **9**, as aminoacridinas, os nitroimidazoles, as quinolonas e, as fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina **10**, são alguns agentes antibacterianos que atuam neste processo, embora em fases diferentes.⁷ As aminoacridinas atuam como agentes intercalantes enquanto que as quinolonas e fluoroquinolonas inibem a DNA girase. Em ambos os casos, as moléculas conduzem à inibição da replicação e transcrição do DNA, levando à morte da célula.^{7,9} As rifamicinas **8** inibem a RNA polimerase, bloqueando assim a biossíntese do RNA.⁹ Os nitroimidazoles e a nitrofurantoína **9** são reduzidos dentro da célula, produzindo espécies reativas que causam danos no DNA, conduzindo à morte da bactéria.⁷

A gramicidina A **11**, a valinomicina **12**, a polimixina B **13** e a daptomicina **1** são péptidos que têm como alvo a membrana plasmática das bactérias (Figura 1.2d).⁸ Os dois primeiros atuam como ionóforos, possibilitando o movimento descontrolado de íons através da membrana celular, que conduz à morte da bactéria.⁷ Por outro lado, a polimixina B **13** liga-se à membrana plasmática das bactérias, tornando-a mais permeável e permitindo o movimento de pequenas moléculas através desta.¹⁰ Por último, a daptomicina **1**, um agente antibacteriano introduzido em 2003, induz a rápida dissipação do potencial de membrana, conduzindo assim à morte da bactéria.¹¹

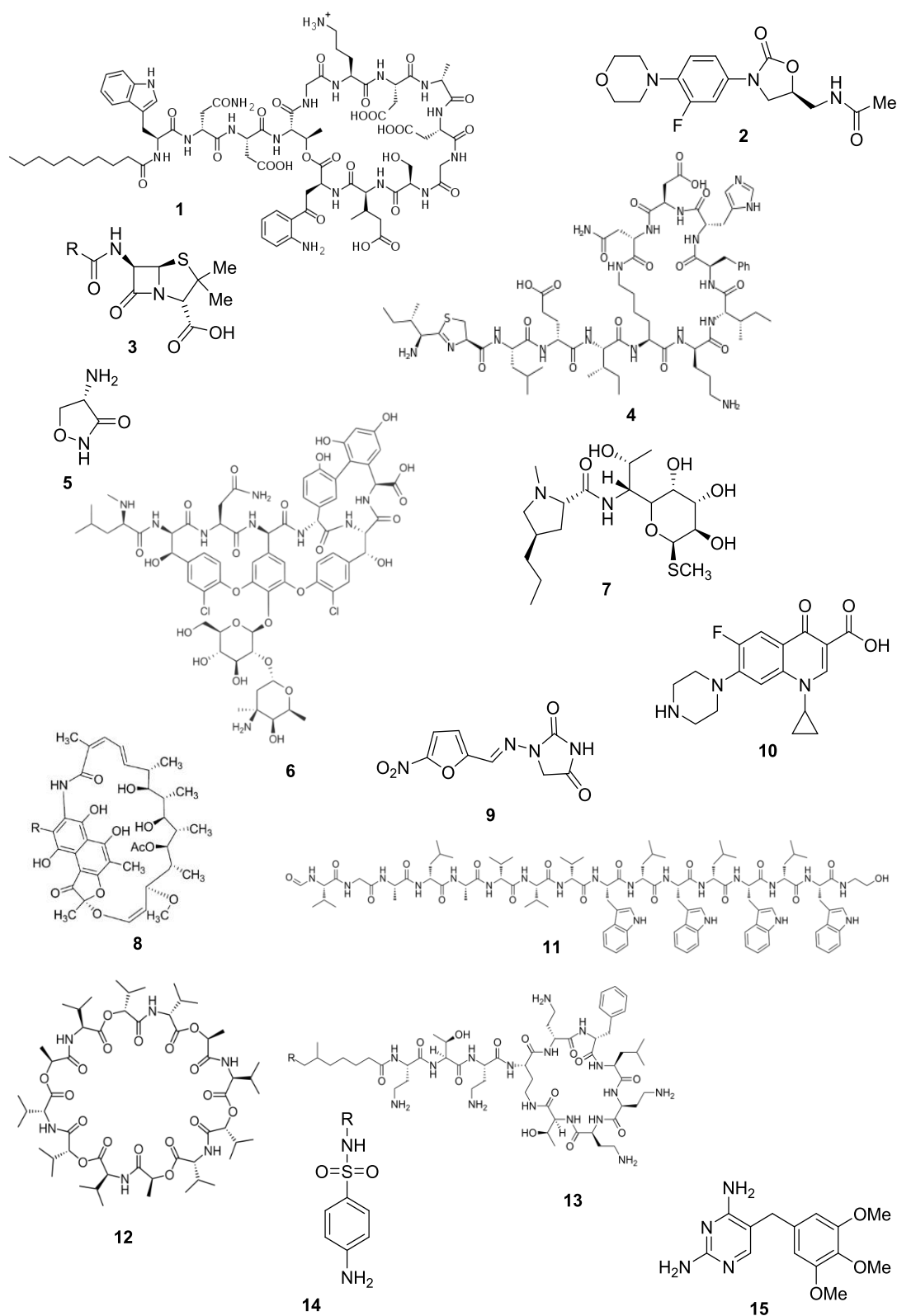


Figura 1.5. Estruturas dos principais agentes antibacterianos.

A inibição da biossíntese do ácido fólico (Figura 1.2e) também constitui um alvo para fármacos com atividade antibacteriana, nomeadamente das sulfonamidas **14** e da trimetoprima **15**.⁸ Estes fármacos têm como alvo diferentes enzimas envolvidas na biossíntese do tetrahydrofolato (Figura 1.6). As sulfonamidas **14** são análogos do ácido *p*-aminobenzoico e, atuam como inibidores da dihydropteroato sintetase. Já a trimetoprima **15** inibe a dihydrofolato reductase, impedindo assim a biossíntese de tetrahydrofolato.⁷

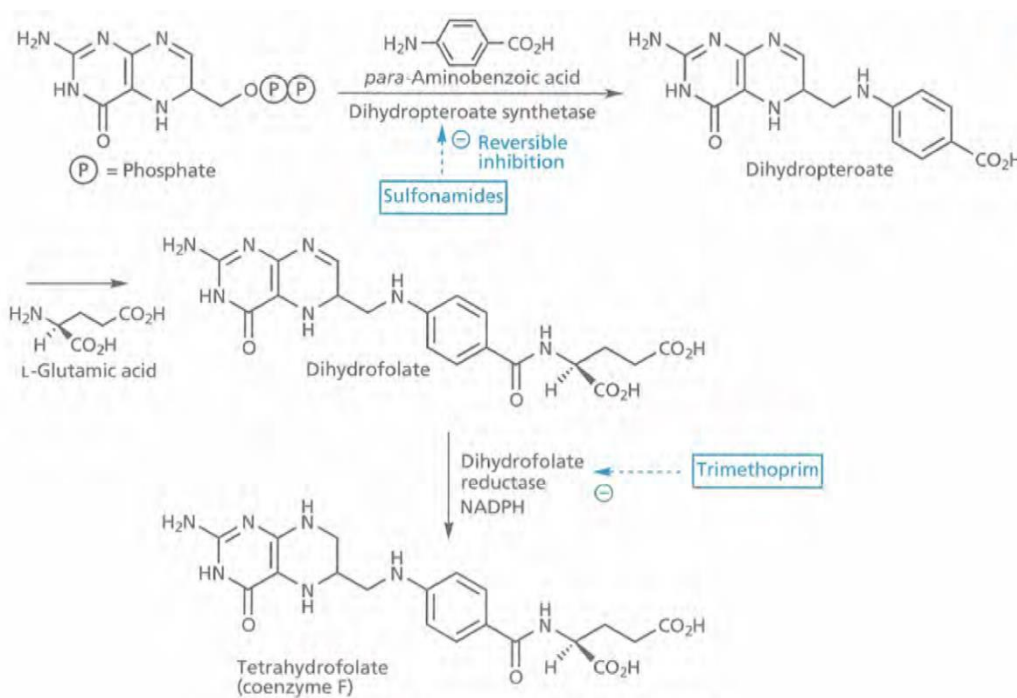


Figura 1.6. Mecanismo de ação das sulfonamidas e da trimetoprima.⁷

Porém, a utilização abusiva de antibacterianos contribuiu para o aparecimento de bactérias resistentes a estes.⁸ A figura 1.7 mostra que já foi observada resistência para todos os fármacos desenvolvidos,⁸ o que constitui uma ameaça emergente para a saúde mundial.^{12,13} Adicionalmente, o problema tem vindo a agravar-se com a descoberta de bactérias resistentes a mais do que uma classe de antibacterianos, fenómeno denominado de multirresistência.^{14,15} Entre as bactérias patogénicas multirresistentes mais comuns encontram-se *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁶

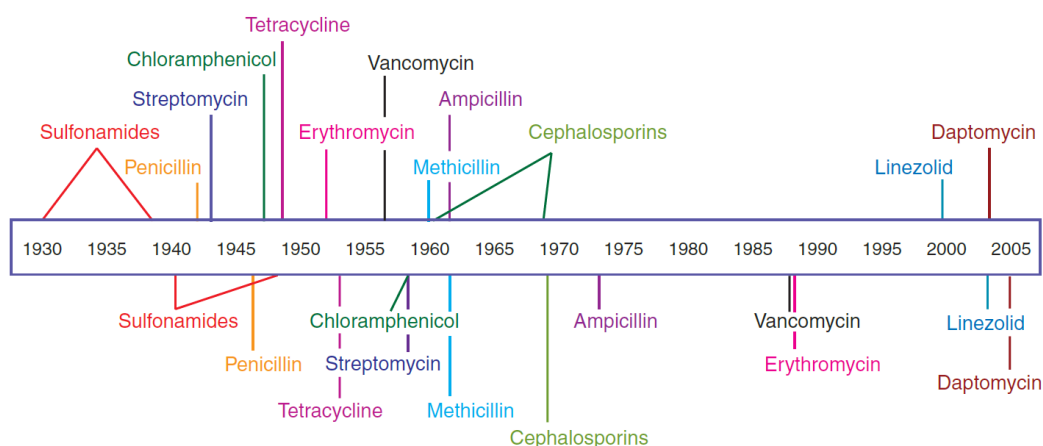


Figura 1.7. Linha temporal da descoberta de alguns agentes antibacterianos e da observação de resistência aos mesmos. Superior à linha está representada a data de descoberta dos diversos antibacterianos e, inferior à linha está representada a data de desenvolvimento de resistência aos mesmos. Adaptado de ⁸.

1.2. Fungos e agentes antifúngicos

Os fungos são seres eucariontes e, como tal possuem um núcleo individualizado onde permanece a maior parte do DNA das células, delimitado pela membrana nuclear. Ao contrário das bactérias, os fungos possuem organelos como mitocôndrias, retículo endoplasmático, vacúolo entre outros e, os ribossomas citosólicos são 80S.⁴ Os fungos contêm esteróis na membrana plasmática, nomeadamente o ergosterol¹⁷ e, a parede celular é constituída por quitina, glucanos, mananos e glicoproteínas.¹⁸ Relativamente à morfologia dos fungos, estes podem ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares (hifas). Existem alguns fungos que englobam as duas morfologias no seu ciclo de vida, denominados fungos dimórficos, como *Candida albicans*.^{4,14} O tipo de fungos mais comum são os fungos multicelulares que consistem em longos filamentos de células unidas. Estes filamentos são chamados de hifas. Por outro lado, as leveduras são células maiores que as bactérias e, são tipicamente esféricas ou ovais.⁴

Nem todos os fungos são patogénicos para o Homem.¹⁹ No entanto, as infeções fúngicas têm vindo a aumentar nos últimos anos, tornando-se um sério problema de saúde. O risco de desenvolver uma infeção fúngica é mais elevado

após uma cirurgia ou transplante e em doentes imunocomprometidos ou com cancro.^{19,20} Os fungos patogênicos encontrados mais frequentemente pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*. Alguns destes existem naturalmente na flora humana, enquanto que outros podem ser adquiridos do meio envolvente.¹⁹ Atualmente, vários fármacos com atividade antifúngica estão disponíveis para o combate de infecções fúngicas.²¹ No entanto, o desenvolvimento de novos fármacos eficazes é uma tarefa complicada, uma vez que os fungos, como organismos eucariontes, apresentam mecanismos idênticos aos dos mamíferos para a biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos. Desta forma, os antifúngicos devem atuar preferencialmente em processos presentes apenas em fungos de forma a apresentarem uma toxicidade seletiva.^{4,14}

O primeiro composto conhecido com atividade antifúngica – griseofulvina **16** - foi isolado em 1939, mas só ficou disponível para uso terapêutico em 1958. Entretanto, foram identificados outros compostos com atividade antifúngica, nomeadamente o primeiro azole e o primeiro polieno.²² O interesse por esta área aumentou e, até 2000, as principais classes de antifúngicos utilizados atualmente tinham sido descobertas, como é possível verificar na figura 1.8.^{22,23}

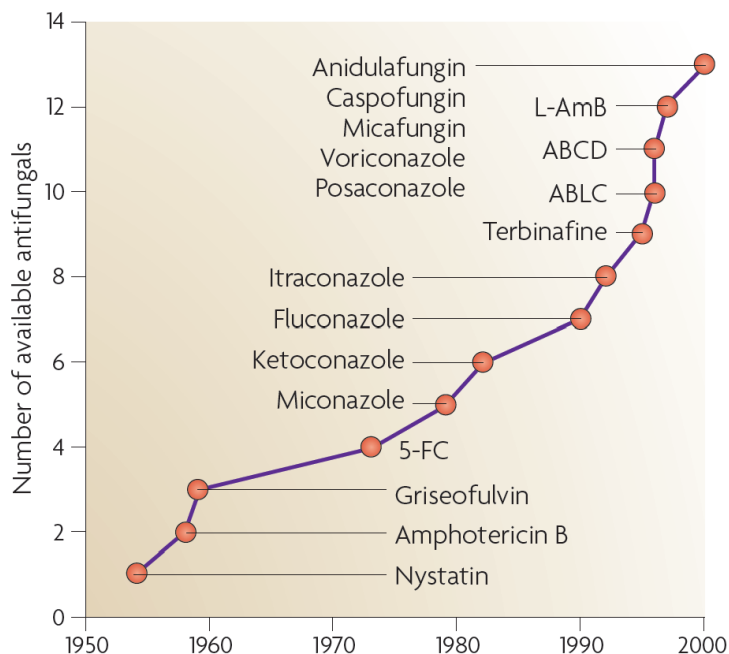


Figura 1.8. Linha temporal do desenvolvimento dos principais antifúngicos. O gráfico inclui o nome, o número e a taxa de desenvolvimento dos principais antifúngicos disponíveis, entre 1950 e 2000. ABCD – dispersão coloidal de anfotericina B; ABLC – complexo lipídico de anfotericina B; 5-FC - flucitosina; L-AmB - forma lipossomal de anfotericina B.²³

Na figura 1.9 encontram-se representados os principais agentes antifúngicos e os respetivos alvos.²⁴

Os azoles, como o fluconazole **17** e o miconazole **18**, as alilaminas, como a terbinafina **19** e os tiocarbamatos, como o tolnaftato **20**, inibem a biossíntese do ergosterol em diferentes etapas.²⁵ O ergosterol regula a fluidez e assimetria da membrana plasmática, sendo importante para a manutenção da integridade da célula.¹⁷ Os azoles atuam como inibidores da enzima lanosterol 14- α -demetilase, impedindo assim a biossíntese do ergosterol, que leva à alteração da estrutura e função da membrana plasmática e, consequentemente à inibição do crescimento celular.^{25,26} Nos mamíferos, os azoles também afetam a biossíntese do colesterol mas a concentração necessária para causar uma inibição equivalente é cerca de 250 vezes superior, o que os torna fármacos pouco tóxicos.²⁵ Por sua vez, as alilaminas e os tiocarbamatos inibem a esqualeno-epoxidase, impedindo a epoxidação do esqualeno. A acumulação deste

promove o aumento da permeabilidade da membrana celular, provocando a morte celular.^{24,25}

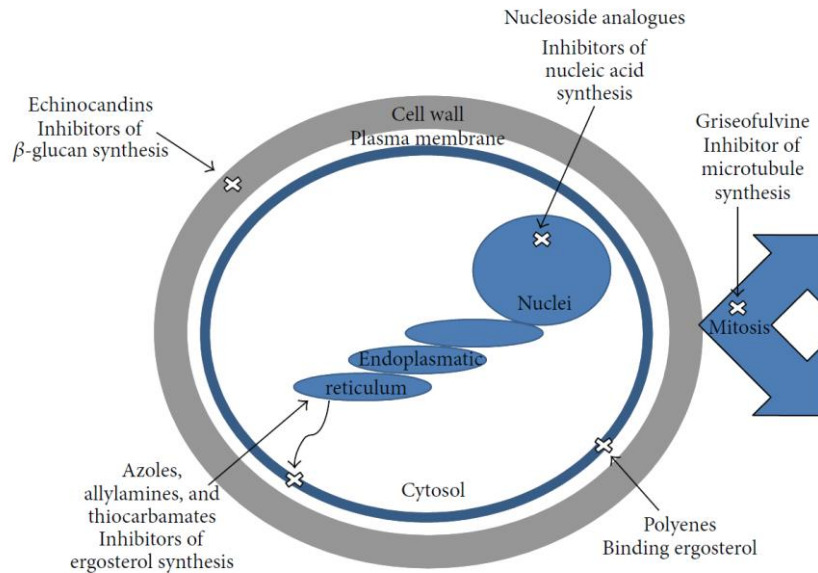


Figura 1.9. Mecanismo de ação dos principais agentes antifúngicos. As equinocandinas inibem a síntese da parede celular; os azoles, as alilaminas e os tiocarbamatos interferem com a síntese do ergosterol; os polienos ligam-se ao ergosterol levando à perda de integridade da membrana plasmática; a griseofulvina inibe a síntese dos microtúbulos; os análogos de nucleósidos inibem a síntese dos ácidos nucleicos.²⁴

Os polienos também têm como alvo o ergosterol. A ligação destes ao ergosterol induz a formação de canais aquosos na membrana que alteram a permeabilidade da mesma.^{25,27} Os canais formados permitem a perda de componentes vitais para a célula, resultando em morte celular.^{24,25} A anfotericina B **21**, o polieno mais conhecido, tem alguns efeitos adversos para as células de mamífero.²¹ No entanto, estes efeitos podem ser minimizados recorrendo a formulações lipídicas. Atualmente, a anfotericina B **21** é administrada após a sua incorporação em lipossomas.²⁷

A composição da parede celular dos fungos é única, uma vez que os seus constituintes não se encontram presentes nas paredes celulares de outros microrganismos. Assim, os seus componentes tornam-se alvos atrativos para o desenvolvimento de novos antifúngicos.²⁸ Atualmente, existe apenas uma

classe de antifúngicos disponível comercialmente que têm como alvo a parede celular – as equinocandinas, como a caspofungina **22**.²⁹ Estes compostos são lipopéptidos que atuam como inibidores não competitivos da β -(1,3)-glucano sintetase,²⁴ uma proteína transmembranar responsável pela biossíntese do β -(1,3)-glucano, um dos componentes da parede celular dos fungos.²⁵ Esta inibição afeta a integridade estrutural da parede celular, tornando a célula mais vulnerável à lise osmótica.²⁴ As equinocandinas são pouco tóxicas, visto que o seu alvo não está presente nas células de mamífero.^{28,29}

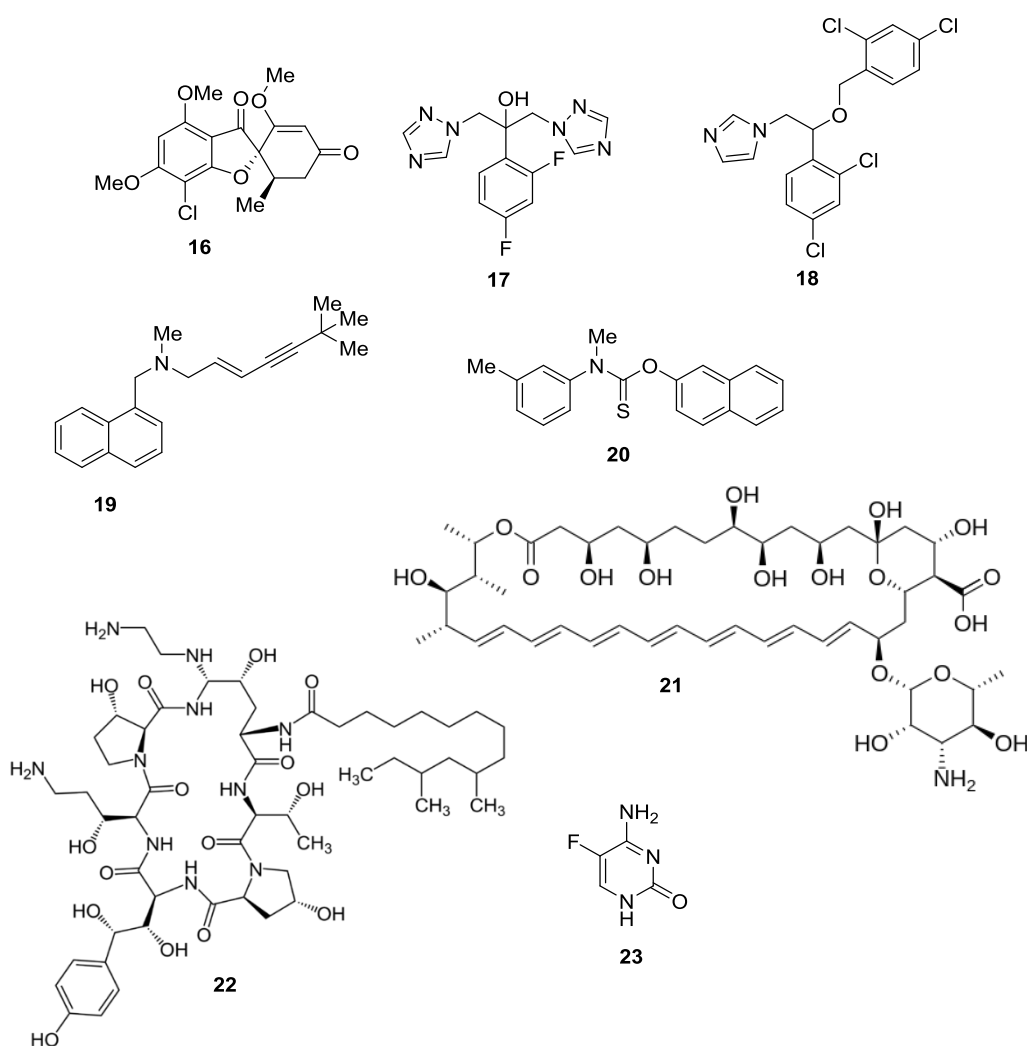


Figura 1.10. Estruturas dos principais agentes antifúngicos.

A flucitosina **23** é uma pró-droga e, um análogo da pirimidina. A entrada da flucitosina **23** nas células dá-se através da citosina permease. Uma vez no interior das células, a flucitosina **23** é convertida pela citosina desaminase na sua forma ativa – o 5-fluorouracilo.^{21,30} Assim, a atividade da flucitosina **23** é dependente da presença e atividade desta enzima.²¹ O 5-fluorouracilo pode exercer o seu efeito de duas formas distintas, nomeadamente através da inibição da biossíntese do DNA ou da síntese proteica. No primeiro caso, pela ação da uridina monofosfato pirofosforilase, o 5-fluorouracilo é convertido no 5-fluorodesoxiuridina monofosfato. Esta atua como um inibidor da timidilato sintase, uma enzima importante para a biossíntese do DNA. Por outro lado, o 5-fluorouracilo pode ser fosforilado originando a 5-fluorouridina monofosfato, que é novamente fosforilada obtendo-se a 5-fluorouridina difosfato. Por fim, esta é fosforilada mais uma vez, sendo convertida em 5-fluorouridina trifosfato. Esta substitui o uracilo na biossíntese do RNA e, consequentemente bloqueia a síntese proteica.^{21,27,30} Normalmente, a flucitosina **23** é bem tolerada, uma vez que as células de mamífero não expressam quantidades significativas da citosina desaminase.³¹ Adicionalmente, a flucitosina **23** é administrada em combinação com outros antifúngicos para minimizar a aquisição de resistência.²⁷

A griseofulvina **16** foi isolada pela primeira vez a partir de *Penicillium griseofulvum* e apresenta um anel tricíclico na sua estrutura.^{24,32} Esta liga-se à tubulina, interferindo na formação dos microtúbulos, afetando o processo de mitose nos fungos, culminando na morte celular.³² A inibição da mitose induzida pela griseofulvina nas células de mamífero é reduzida, sendo assim um antifúngico pouco tóxico.³³

Da mesma forma que o número de bactérias resistentes aos vários antibacterianos disponíveis tem vindo a aumentar, os fungos patogénicos resistentes também.^{34,35} A resistência dos fungos aos agentes antifúngicos pode ser intrínseca ou adquirida.^{14,36} A resistência intrínseca ocorre naturalmente em quase todas as estirpes de uma espécie e, é resultado de características

fisiológicas destas. Por outro lado, os fungos podem adquirir resistência através de mutações no seu genoma.¹⁴

Os mecanismos responsáveis pela resistência dos fungos aos diversos fármacos são comuns quer na resistência intrínseca quer na adquirida e, encontram-se representados na figura 1.11.¹⁴ Entre os vários mecanismos de resistência destacam-se a produção de enzimas que modificam ou inativam o agente antifúngico, a modificação do alvo, o aumento da expressão do alvo, a presença de uma enzima alternativa àquela que é inibida e, a limitação do acesso do fármaco para o alvo através da diminuição da permeabilidade da membrana plasmática ou da indução de proteínas de efluxo.^{15,37} Importa referir, que por vezes, um fungo pode adquirir resistência a um determinado fármaco pela combinação de dois ou mais mecanismos de resistência.²⁵

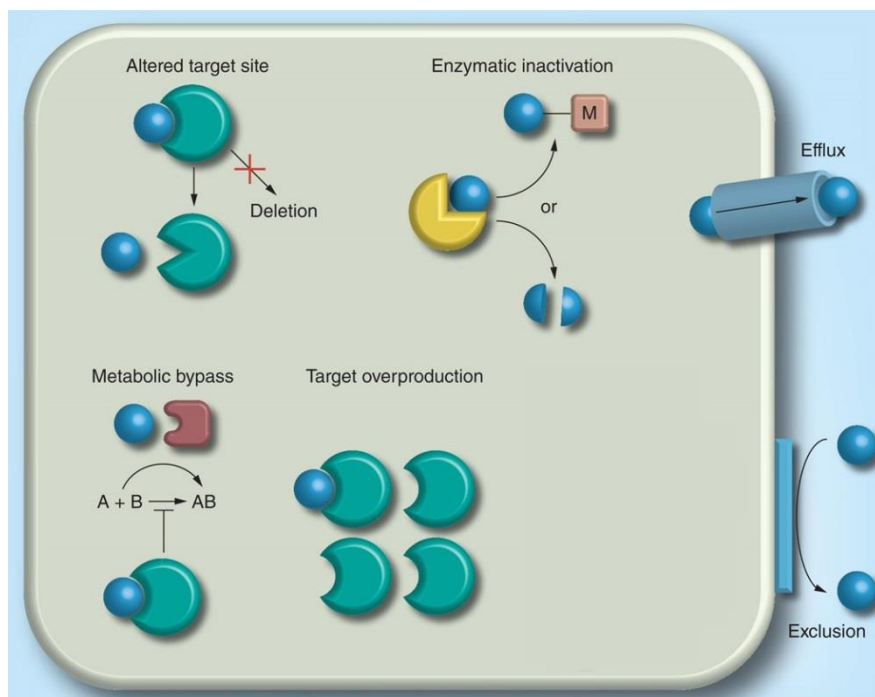


Figura 1.11. Mecanismos responsáveis pela resistência dos fungos aos fármacos. A membrana plasmática pode tornar-se menos permeável aos fármacos (bolas azuis); o fármaco pode ser transportado para fora da célula através de proteínas de efluxo; o fármaco pode sofrer inativação enzimática, através de modificação química (M = acetilação, fosforilação ou adenilação) ou quebra da molécula; o fungo tem capacidade de alterar a estrutura do alvo ou, em casos raros, eliminá-lo; o fungo pode expressar uma enzima alternativa àquela que é afetada e/ou aumentar a expressão do alvo. Adaptado de ³⁸.

1.3. Desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos

A resistência observada aos vários agentes antimicrobianos disponíveis comercialmente torna as abordagens terapêuticas mais limitadas, constituindo um grave problema de saúde mundial.³⁹ Existe por isso uma elevada necessidade de encontrar novos agentes antimicrobianos, que apresentem estruturas totalmente novas e, mecanismos de ação distintos dos atuais.⁴⁰

1.3.1. Purinas

A purina, representada na figura 1.12, é um dos heterociclos de nitrogénio mais abundante na Natureza. O termo purina foi introduzido em 1884 por Emil Fisher e, a primeira síntese desta estrutura ocorreu em 1898.⁴¹

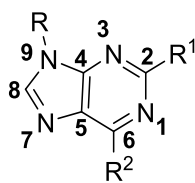


Figura 1.12. Representação do núcleo de purina, com a respetiva numeração.

As purinas desempenham um papel importante nos sistemas biológicos, nomeadamente na constituição dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), já que constituem a estrutura base da adenina e da guanina.⁴² Adicionalmente, as purinas estão envolvidas em diversos processos metabólicos funcionando como substrato e co-factor de várias enzimas e recetores.⁴³ Como exemplo de compostos endógenos contendo o núcleo de purina encontram-se o ATP, o GTP, o cAMP e o cGMP que são importantes em diferentes fases do ciclo celular, na sinalização celular e, em muitos outros processos biológicos.⁴²

O núcleo de purina tem-se tornado uma estrutura privilegiada em Química Medicinal, uma vez que existem várias abordagens que permitem a introdução de diferentes substituintes no anel de purina, contribuindo para a grande diversidade de aplicações biológicas que lhes tem sido associada – Figura 1.13.⁴³

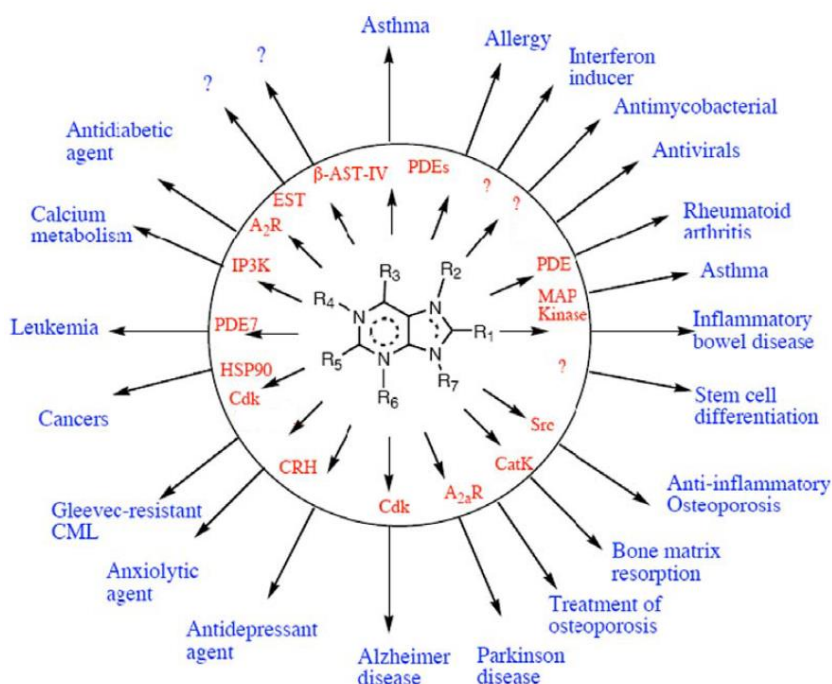


Figura 1.13. Potenciais aplicações dos derivados de purina. A combinação de vários substituintes (R1-R7) em diferentes posições do anel de purina induz a inibição dos diferentes alvos representados a vermelho. As potenciais aplicações terapêuticas encontram-se representadas a azul, sendo que quando o alvo e/ou a aplicação terapêutica ainda são desconhecidos, representa-se um ponto de interrogação. PDE – Fosfodiesterases (phosphodiesterases); β-AST-IV – β-aryl sulfotransferase-IV (β-aryl sulfotransferase-IV); EST – Estrogénio sulfotransferase (estrogen sulfotransferase); A₂R – Recetores de adenosina (adenosine receptors); IP3K – Inositol-1,4,5-trifosfato-3-cinase (inositol-1,4,5-triphosphate-3-kinase); HSP90 – Proteína de choque térmico 90 (heat shock protein 90); Cdk – Cinase dependente de ciclinas (cyclin-dependent kinase); CRH – Recetor da hormona libertadora de corticotropina (corticotropin-releasing hormone receptor); CatK – Catepsina K (cathepsin K); Src – Tirosina cinase Scr (Scr tyrosine kinase); MAP kinase – Proteína cinase ativada por mitogénese (mitogen-activated protein kinase). Adaptado de ⁴³.

Derivados sintéticos de purinas possuem um elevado potencial no sentido em que podem interferir com vários processos biológicos, levando à inibição de enzimas e, funcionando como agonistas/antagonistas de recetores, como por exemplo dos recetores de adenosina.⁴³

Alguns derivados de purina, como o composto **24**, foram descritos como inibidores da enzima inositol-1,4,5-trifosfato-3-cinase, que tem um papel importante na regulação dos níveis de cálcio intracelular.⁴⁴

As enzimas fosfodiesterases são um alvo importante no desenvolvimento de novas moléculas ativas, uma vez que hidrolisam mensageiros secundários como cAMP e cGMP, que estão por sua vez envolvidos em diversos processos biológicos. Alguns derivados de purina, como o composto **25**, têm sido descritos como inibidores destas enzimas e demonstraram eficácia em modelos de artrite reumatoide, esclerose múltipla e doenças autoimunes.⁴⁵

A purina **26** foi descrita como um potente inibidor da leucotrieno A4 hidrolase. Esta enzima está envolvida na biossíntese do leucotrieno A4 e, é um mediador pró-inflamatório importante envolvido em inúmeras doenças como asma e artrite reumatoide.⁴⁶

Chang *et al*⁴⁷ demonstraram que o mioseverin **27** atua pela inibição da polimerização da tubulina, e provoca a paragem do ciclo celular na transição G2/M. Em estudos posteriores, foram identificados derivados de purina que não atuam diretamente na tubulina mas desestabilizam os microtúbulos do citoesqueleto, como o composto **28**.⁴⁸

Algumas purinas, como o derivado **29**, foram descritas como inibidores da HSP90.⁴⁹ Esta proteína está envolvida na maturação de proteínas oncogénicas, como a Cdk4, entre outras. A inibição da HSP90 resulta na degradação das proteínas oncogénicas no proteossoma, representando desta forma um alvo muito relevante na terapia anticancerígena.⁵⁰

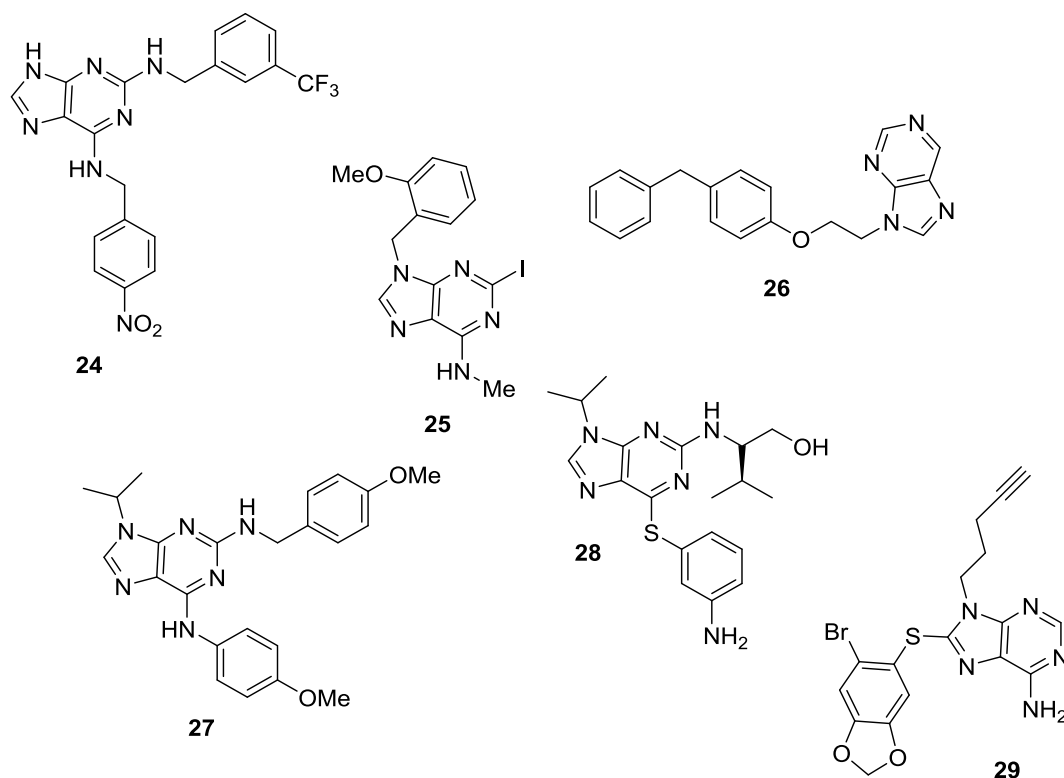


Figura 1.14. Estrutura de derivados de purina com potenciais aplicações biológicas.

Além disso, já foram descritos derivados de purina com atividade antimicrobiana. Hu *et al*⁵¹ sintetizaram vários derivados de purina contendo diferentes substituintes em C2 e C6 e, a determinação da atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Candida tropicalis* revelou que os derivados 30 e 31 eram compostos muito promissores, uma vez que foram considerados muito ativos contra estes fungos e, apresentavam atividade antifúngica comparável com o antifúngico de referência utilizado (fluconazole). Adicionalmente, Murti *et al*⁵² avaliaram a atividade antifúngica de purinas substituídas em N9 contra *Aspergillus niger* e *Candida albicans* e, os derivados 32 e 33 apresentaram uma atividade antifúngica comparável com o composto de referência utilizado, o fluconazole. Além disso, avaliaram a atividade dos derivados de purina contra duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e duas Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), tendo-se obtido os melhores resultados de atividade antibacteriana para os derivados 32 e 34.

Adicionalmente, os derivados de purina têm-se revelado um grupo de moléculas promissoras no combate a *Mycobacterium tuberculosis*. Estudos de

relação estrutura-atividade demonstraram que a natureza dos substituintes nas posições 2, 6, 8 e 9 do anel de purina exercem uma elevada influência na atividade.⁵³ Purinas com benzil em N9 e furil em C6 exibiram resultados de atividade antimicobacteriana muito promissores, nomeadamente o composto 35.⁵⁴

Recentemente, no grupo de investigação, foram sintetizados novos derivados de purina com substituintes aromáticos em N9 e C2 e, aminas secundárias em C6 que obtiveram resultados muito promissores contra *Mycobacterium tuberculosis*. Verificou-se ainda que a atividade destes depende dos substituintes em C2, C6 e N9 da molécula.⁵³

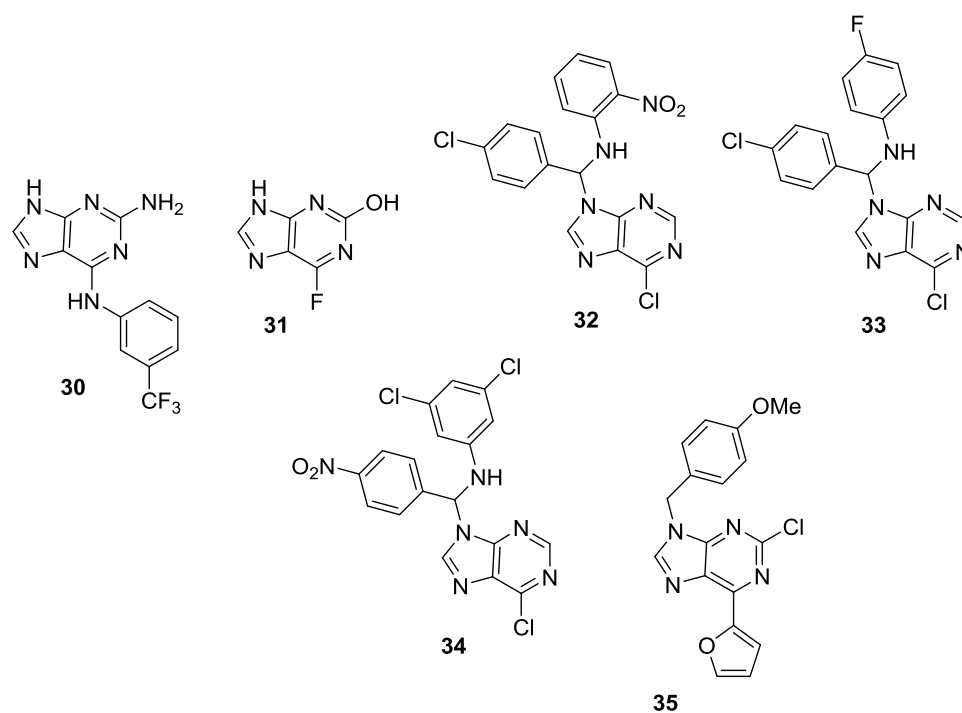


Figura 1.15. Estruturas de derivados de purina com atividade antimicrobiana.

1.3.2 Polifenóis

Os polifenóis são estruturas importantes devido à enorme variedade de aplicações biológicas que lhes têm sido associadas. Têm sido descritos como tendo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antibacterianas e antifúngicas. As plantas são uma fonte importante de polifenóis, uma vez que uma grande diversidade de compostos polifenólicos têm sido isolados a partir destas.⁵⁵

Estruturalmente, estes compostos apresentam pelo menos um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxilo e, podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides.^{55,56}

Os compostos fenólicos mais simples bem como ácidos fenólicos constituem o grupo dos compostos não flavonóides. Como exemplo de compostos fenólicos simples encontram-se o catecol **36** e o pirogallol **37**. São moléculas compostas apenas por um anel aromático contendo dois e três grupos hidroxilo, respetivamente. Estes compostos possuem atividade antibacteriana e antifúngica, sendo o pirogallol **37** o mais ativo.⁵⁷

Os ácidos fenólicos podem ser divididos nos derivados do ácido benzóico, como ácido gálico **38** e protocatéquico e, nos derivados do ácido cinâmico, como o ácido *p*-cumárico **39**, cafeico **40** e ferúlico.⁵⁶ Os ácidos fenólicos exibem atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).⁵⁸

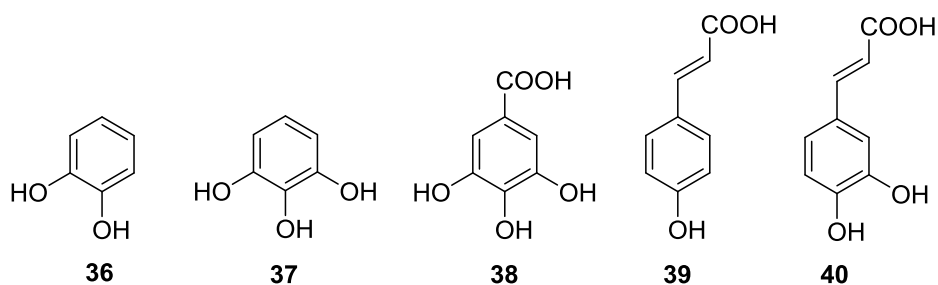


Figura 1.16. Estruturas dos principais compostos fenólicos mais simples e ácidos fenólicos.

Os flavonóides constituem o outro grupo de polifenóis. Estruturalmente, os flavonóides são formados por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um terceiro anel, um anel de pirano (C) – Figura 1.17.⁵⁹ Esta classe de polifenóis pode ser dividida em várias famílias de acordo com o seu estado de oxidação, destacando-se os flavanóis **41**, os flavonóis **42**, as flavonas **43** e as flavanonas **44**.⁵⁶

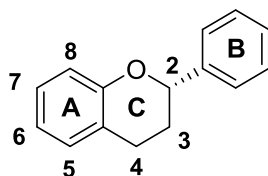


Figura 1.17. Representação do núcleo dos flavonóides.

Os flavanóis **41** mais abundantes na Natureza possuem a estrutura base do flavonóide e grupos hidroxilos nos anéis A e B e, ainda um grupo hidroxilo no carbono 3 do anel C.⁵⁹ A (+)-catequina **41a**, a (-)-epicatequina **41b** e a (-)-epigallocatequina **41c** são alguns exemplos de flavanóis que possuem atividade antibacteriana e antifúngica.^{50,53}

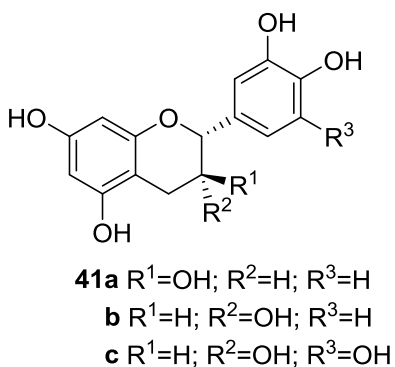
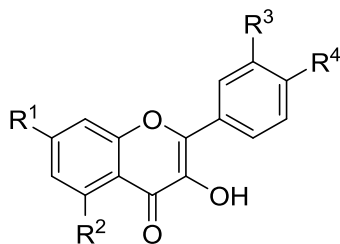


Figura 1.18. Estrutura do núcleo dos flavanóis.

Os flavonóis **42** são estruturalmente semelhantes aos flavanóis **41**, sendo a principal diferença a presença de um grupo carbonilo na posição 4 do anel C. A quercetina **42a** é um exemplo desta classe de compostos.⁵⁹ Os flavonóis **42** apresentam uma elevada variedade de atividades biológicas.⁶⁰



42a R¹=OH; R²=OH; R³=OH; R⁴=OH

Figura 1.19. Estrutura do núcleo dos flavonóis.

As flavonas **43** e as flavanonas **44** possuem estruturas idênticas, sendo a principal diferença a existência de uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C nas flavonas **43**.⁵⁹

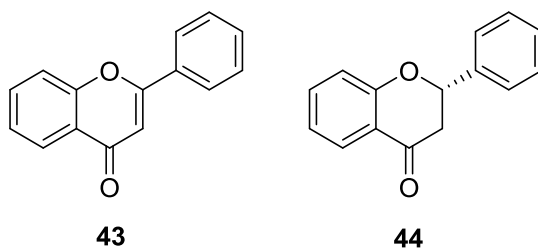


Figura 1.20. Estrutura do núcleo da flavona e da flavonona.

Os polifenóis têm sido combinados com vários agentes antimicrobianos disponíveis comercialmente tendo-se obtido um efeito sinérgico, mesmo contra estirpes resistentes.^{61,62} Desta forma, esta classe de compostos tem-se revelado bastante promissora para o tratamento de doenças infecciosas.

Os compostos polifenólicos têm sido largamente estudados devido ao seu possível envolvimento na prevenção e tratamento de doenças crónicas, como cancro, osteoporose, diabetes e doenças neurodegenerativas. A atividade dos polifenóis foi inicialmente justificada pela sua capacidade antioxidante e

devido às propriedades para quelar íons metálicos.⁵⁶ No entanto, nos últimos anos tem-lhes sido atribuída a capacidade de inibir ou reduzir diferentes enzimas, como telomerase,⁶³ ciclooxigenase⁶⁴ ou lipooxigenase.⁶⁵ Além disso, a capacidade de inativarem toxinas bacterianas tem sido largamente descrita assim como a ruptura da membrana plasmática dos microrganismos, justificando as propriedades antimicrobianas.⁵⁵ Recentemente, foi também reportada a interação de moléculas polifenólicas com vias de transdução de sinal e com recetores celulares.⁶⁶⁻⁶⁸

1.4. Referências bibliográficas

- 1 WHO. *Infectious diseases*, <http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/> (2013).
- 2 Hay, A. J., Gregory, V., Douglas, A. R. & Lin, Y. P. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 1861-1870 (2001).
- 3 WHO. *Infectious diseases*, <http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf> (2004).
- 4 Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. *Microbiology: an introduction*. 10th edn, (Benjamin Cummings, USA, 2010).
- 5 Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **10**, 226-236 (1929).
- 6 Jagusztyn-Krynicka, E. K. & Wyszynska, A. The decline of antibiotic era-- new approaches for antibacterial drug discovery. *Pol J Microbiol* **57**, 91-98 (2008).
- 7 Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4 edn, (Oxford University Press, 2009).
- 8 Clatworthy, A. E., Pierson, E. & Hung, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol* **3**, 541-548 (2007).
- 9 Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* **8**, 423-435 (2010).
- 10 Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J. & Nation, R. L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother* **60**, 1206-1215 (2007).
- 11 Sauermann, R., Rothenburger, M., Graninger, W. & Joukhadar, C. Daptomycin: a review 4 years after first approval. *Pharmacology* **81**, 79-91 (2008).
- 12 Service, R. F. Antibiotics That Resist Resistance. *Science* **270**, 724-727 (1995).
- 13 Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**, 775-781 (2000).

- 14 Schaechter, M. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2nd edn, (Academic Press Inc., USA, 2009).
- 15 Yoneyama, H. & Katsumata, R. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 1060-1075 (2006).
- 16 Magiorakos, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **18**, 268-281 (2012).
- 17 Parks, L. W., Smith, S. J. & Crowley, J. H. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast--a review. *Lipids* **30**, 227-230 (1995).
- 18 Bowman, S. M. & Free, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **28**, 799-808 (2006).
- 19 Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. & Kozik, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* **56**, 211-224 (2009).
- 20 Richardson, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **56 Suppl 1**, i5-i11 (2005).
- 21 Bryskier, A. *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals*. 1st edn, (ASM Press, USA, 2005).
- 22 Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A. & Sibley, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* **12**, 40-79 (1999).
- 23 Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C. & Rex, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 719-727 (2010).
- 24 Spampinato, C. & Leonardi, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int* **2013**, 204237 (2013).
- 25 Ghannoum, M. A. & Rice, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**, 501-517 (1999).

- 26 Kathiravan, M. K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorg Med Chem* **20**, 5678-5698 (2012).
- 27 Johnson, M. D. & Perfect, J. R. Use of Antifungal Combination Therapy: Agents, Order, and Timing. *Curr Fungal Infect Rep* **4**, 87-95 (2010).
- 28 Denning, D. W. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet* **362**, 1142-1151 (2003).
- 29 Denning, D. W. Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother* **49**, 889-891 (2002).
- 30 Vermes, A., Guchelaar, H. J. & Dankert, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* **46**, 171-179 (2000).
- 31 Mullen, C. A., Kilstrup, M. & Blaese, R. M. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 33-37 (1992).
- 32 De Carli, L. & Larizza, L. Griseofulvin. *Mutat Res* **195**, 91-126 (1988).
- 33 Panda, D., Rathinasamy, K., Santra, M. K. & Wilson, L. Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: Implications for its possible use in the treatment of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9878-9883 (2005).
- 34 Loeffler, J. & Stevens, D. A. Antifungal Drug Resistance. *Clin Infect Dis* **36**, S31-S41 (2003).
- 35 Gulshan, K. & Moye-Rowley, W. S. Multidrug Resistance in Fungi. *Eukaryot Cell* **6**, 1933-1942 (2007).
- 36 Pasqualotto, A. C. & Denning, D. W. New and emerging treatments for fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **61**, i19-i30 (2008).
- 37 Sosa, A. J. *et al.* *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. 1st edn, (Springer, USA, 2010).
- 38 Schweizer, H. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiol* **7**, 1389-1399 (2012).

- 39 Kanafani, Z. A. & Perfect, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin Infect Dis* **46**, 120-128 (2008).
- 40 Kharb, R., Sharma, P. C. & Yar, M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. *J Enzyme Inhib Med Chem* **26**, 1-21 (2011).
- 41 Rosemeyer, H. The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chem Biodivers* **1**, 361-401 (2004).
- 42 Legraverend, M. Recent advances in the synthesis of purine derivatives and their precursors. *Tetrahedron* **64**, 8585-8603 (2008).
- 43 Legraverend, M. & Grierson, D. S. The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg Med Chem* **14**, 3987-4006 (2006).
- 44 Chang, Y. T. *et al.* Purine-based inhibitors of inositol-1,4,5-trisphosphate-3-kinase. *Chembiochem* **3**, 897-901 (2002).
- 45 Raboisson, P. *et al.* Design, synthesis and structure-activity relationships of a series of 9-substituted adenine derivatives as selective phosphodiesterase type-4 inhibitors. *Eur J Med Chem* **38**, 199-214 (2003).
- 46 Penning, T. D. *et al.* Synthesis of Imidazopyridines and Purines as Potent Inhibitors of Leukotriene A4 Hydrolase. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 1137-1139 (2003).
- 47 Chang, Y. T. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Myoseverin Derivatives: Microtubule Assembly Inhibitors. *J Med Chem* **44**, 4497-4500 (2001).
- 48 Wignall, S. M. *et al.* Identification of a novel protein regulating microtubule stability through a chemical approach. *Chem Biol* **11**, 135-146 (2004).
- 49 Llauger, L. *et al.* Evaluation of 8-Arylsulfanyl, 8-Arylsulfoxyl, and 8-Arylsulfonyl Adenine Derivatives as Inhibitors of the Heat Shock Protein 90. *J Med Chem* **48**, 2892-2905 (2005).
- 50 Maloney, A. & Workman, P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther* **2**, 3-24 (2002).
- 51 Hu, Y. L., Liu, X. & Lu, M. Synthesis and Biological Activity of Novel 6-Substituted Purine Derivatives. *J Mex Chem Soc* **54**, 74-78 (2010).

- 52 Murti, Y., Badal, N. & Pathak, D. Synthesis, spectral studies and biological screening of 6-Chloropurine derivatives. *Int Pharm Sci* **1**, 116-122 (2011).
- 53 Correia, C., Carvalho, M. A. & Proença, M. F. Synthesis and *in vitro* activity of 6-amino-2,9-diaryl purines for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tetrahedron* **65**, 6903-6911 (2009).
- 54 Bakkestuen, A. K., Gundersen, L. L. & Utenova, B. T. Synthesis, Biological Activity, and SAR of Antimycobacterial 9-Aryl-, 9-Arylsulfonyl-, and 9-Benzyl-6-(2-furyl)purines. *J Med Chem* **48**, 2710-2723 (2005).
- 55 Ferrazzano, G. F. *et al.* Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules* **16**, 1486-1507 (2011).
- 56 Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* **23**, 174-181 (2012).
- 57 Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**, 564-582 (1999).
- 58 Saavedra, M. J. *et al.* Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Med Chem* **6**, 174-183 (2010).
- 59 Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246 (2010).
- 60 Cushnie, T. P., Hamilton, V. E., Chapman, D. G., Taylor, P. W. & Lamb, A. J. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *J Appl Microbiol* **103**, 1562-1567 (2007).
- 61 Lin, R. D., Chin, Y. P., Hou, W. C. & Lee, M. H. The effects of antibiotics combined with natural polyphenols against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Planta Med* **74**, 840-846 (2008).
- 62 Hu, Z. Q. *et al.* Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 558-560 (2002).

- 63 Naasani, I. *et al.* Blocking Telomerase by Dietary Polyphenols Is a Major Mechanism for Limiting the Growth of Human Cancer Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Res* **63**, 824-830 (2003).
- 64 Hussain, T., Gupta, S., Adhami, V. M. & Mukhtar, H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer* **113**, 660-669 (2005).
- 65 Sadik, C. D., Sies, H. & Schewe, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol* **65**, 773-781 (2003).
- 66 Kong, A. N., Yu, R., Chen, C., Mandlekar, S. & Primiano, T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res* **23**, 1-16 (2000).
- 67 Spencer, J. P., Rice-Evans, C. & Williams, R. J. Modulation of Pro-survival Akt/Protein Kinase B and ERK1/2 Signaling Cascades by Quercetin and Its *in Vivo* Metabolites Underlie Their Action on Neuronal Viability. *J Biol Chem* **278**, 34783-34793 (2003).
- 68 Wiseman, S., Mulder, T. & Rietveld, A. Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathways *in vitro*. *Antioxid Redox Signal* **3**, 1009-1021 (2001).

Capítulo 2

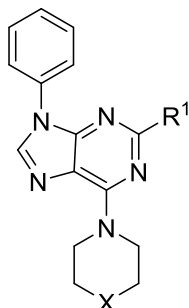
Objetivos

2. Objetivos

As doenças infecciosas são causadas por bactérias e fungos, entre outros. Estas são responsáveis por aproximadamente 15 milhões de mortes anualmente apesar de existirem atualmente diversos agentes antibacterianos e antifúngicos disponíveis. No entanto, os microrganismos evoluíram e desenvolveram mecanismos de resistência aos vários fármacos. De facto, a resistência observada aos vários antimicrobianos disponíveis comercialmente torna as abordagens terapêuticas mais limitadas, constituindo um grave problema de saúde mundial. Existe, por isso, uma elevada necessidade de encontrar novos agentes antimicrobianos, com estruturas e mecanismos de ação distintos dos atuais.

Derivados de purina e diversos compostos fenólicos com atividade antimicrobiana têm sido descritos na literatura. Assim, a síntese de novos derivados de purina que incorporem unidades fenólicas parece ser uma excelente alternativa no desenho de novas moléculas com possíveis propriedades antimicrobianas. Neste contexto, no presente trabalho pretendeu-se:

- Sintetizar e caracterizar novos derivados de purina contendo unidades fenólicas em C2, aminas secundárias em C6 e fenilo em N9 do anel de purina;
- Avaliar a atividade antifúngica dos compostos novos bem como de compostos anteriormente sintetizados (Figura 2.1) utilizando como modelos celulares *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, com o intuito de estabelecer relações estrutura-atividade;
- Realizar um rastreio fármaco-genómico com o composto mais promissor, para identificar os genes envolvidos nas alterações na sensibilidade ao composto, recorrendo a uma coleção de mutantes de *S. cerevisiae* da Euroscarf.



45a X=CH ₂ ; R ¹ =2-HOC ₆ H ₄	g X=O; R ¹ =2-HOC ₆ H ₄	m X=S; R ¹ =2-HOC ₆ H ₄
b X=CH ₂ ; R ¹ =3-HOC ₆ H ₄	h X=O; R ¹ =3-HOC ₆ H ₄	n X=S; R ¹ =3-HOC ₆ H ₄
c X=CH ₂ ; R ¹ =4-HOC ₆ H ₄	i X=O; R ¹ =4-HOC ₆ H ₄	o X=S; R ¹ =4-HOC ₆ H ₄
d X=CH ₂ ; R ¹ =3,4-(HO) ₂ C ₆ H ₃	j X=O; R ¹ =3,4-(HO) ₂ C ₆ H ₃	p X=S; R ¹ =3,4-(HO) ₂ C ₆ H ₃
e X=CH ₂ ; R ¹ =2,3,4-(HO) ₃ C ₆ H ₂	k X=O; R ¹ =2,3,4-(HO) ₃ C ₆ H ₂	q X=S; R ¹ =2,3,4-(HO) ₃ C ₆ H ₂
f X=CH ₂ ; R ¹ =3,4,5-(HO) ₃ C ₆ H ₂	l X=O; R ¹ =3,4,5-(HO) ₃ C ₆ H ₂	r X=S; R ¹ =3,4,5-(HO) ₃ C ₆ H ₂

Figura 2.1. Estrutura dos derivados de purina estudados. Os derivados de purina **45a-c** e **45g-l** foram anteriormente sintetizados, enquanto que os **45d-f** e **45m-r** correspondem a compostos novos.

Capítulo 3

Síntese e caracterização de 6-amino-9-aryl purinas

3. Síntese e caracterização de 6-amino-9-arilpurinas

O núcleo de purina é um heterociclo de nitrogénio muito versátil, uma vez que apresenta sete pontos de diversidade estrutural (N_1 , N_2 , N_7 , N_9 , C_2 , C_6 e C_8) que permitem a introdução de uma grande variedade de substituintes.^{1,2} Desta forma, a combinação dos substituintes presentes no anel de purina contribui para as diversas aplicações biológicas atribuídas a este núcleo.³

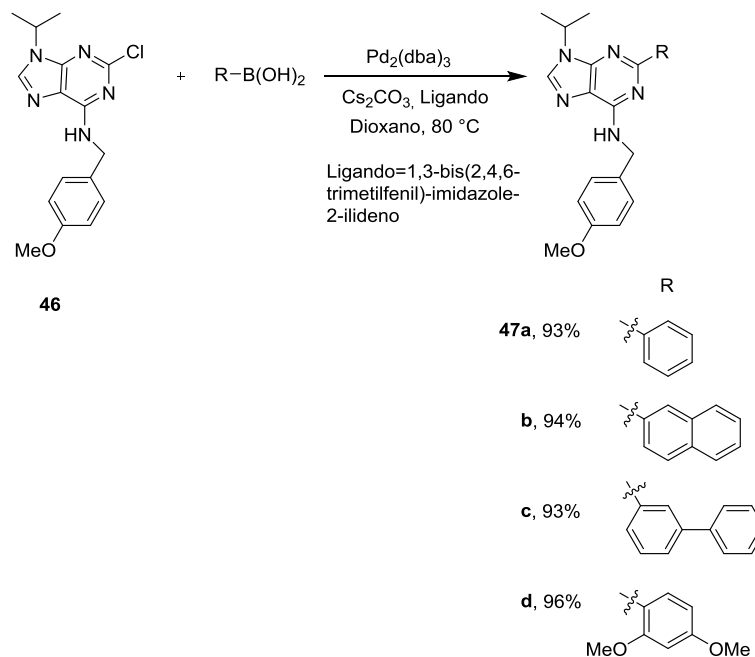
Várias metodologias têm sido desenvolvidas para sintetizar purinas substituídas. Estas baseiam-se essencialmente em duas estratégias. A primeira consiste na modificação direta de purinas reativas funcionalizadas, disponíveis comercialmente. A segunda utiliza como precursores pirimidinas ou imidazoles substituídos, permitindo gerar o anel de purina.¹ Estas estratégias permitem controlar os substituintes introduzidos nas diferentes posições do núcleo de purina.

Uma vez que os compostos desejados **45** são substituídos nas posições 2, 6 e 9 do anel de purina, será feita uma breve revisão dos métodos descritos que permitem a introdução dos grupos pretendidos nas posições referidas.

As abordagens mais comuns para a introdução de diferentes grupos nas posições 2, 6 e 9 do anel de purina baseiam-se na modificação de purinas funcionalizadas.¹

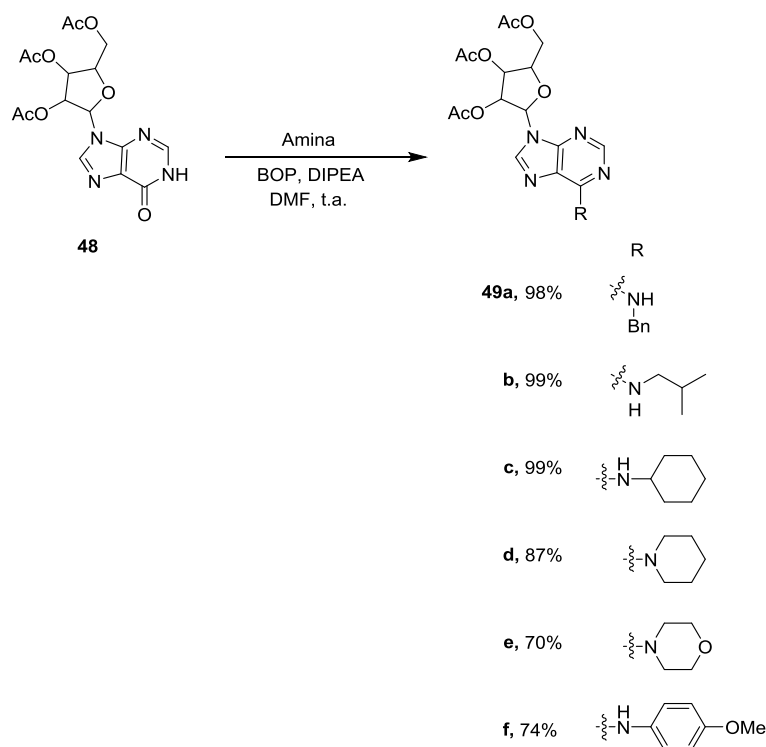
Purinas com grupos arilo em C_2 revelaram-se biologicamente ativas^{4,5}, e têm sido estudadas abordagens sintéticas que permitam a introdução destes grupos. Uma das abordagens mais utilizadas para a síntese de 2-arilpurinas é substituição nucleofílica aromática, em que purinas halogenadas reagem com nucleófilos arílicos. No entanto, uma das limitações deste método é número reduzido de derivados possíveis de sintetizar.^{6,7} Novos métodos de síntese utilizando metais, como o paládio, permitem a obtenção de um maior número de derivados, o que levou a um aumento do interesse por este tipo de reações.^{7,8} Genericamente, a síntese de 2-arilpurinas é realizada em condições anidras, utilizando como reagentes 2-halopurinas e ácidos borónicos, na presença de base, paládio e um ligando.⁷ Os ácidos borónicos têm adquirido um papel importante neste tipo de reações, uma vez que existem vários disponíveis

comercialmente, permitindo a obtenção de uma grande variedade de 2-aryl purinas.⁷ No esquema 3.1, encontra-se representada a síntese das 2-aryl purinas **47** utilizando ácidos borónicos.⁶ No entanto, com base nos métodos anteriormente descritos, não foi reportada, até ao momento, a síntese de derivados de purina com unidades fenólicas em C₂.



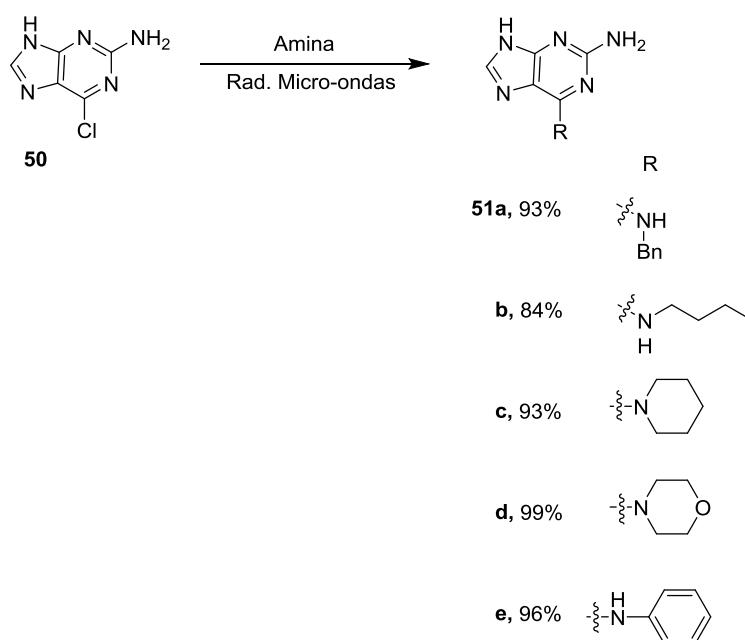
Esquema 3.1. Síntese das 2-aryl purinas **47** por reação da 2-cloropurina **46** com diferentes ácidos borónicos.

Inúmeros métodos foram reportados que permitem a síntese de 6-aminopurinas. No entanto, esses métodos envolvem várias etapas.^{1,9} Em 2005, Wan *et al*⁹ descreveram um método em que foi possível obter 6-aminopurinas, em apenas um passo e com bons rendimentos. As 6-aminopurinas **49** foram sintetizadas por reação do composto **48** com a respetiva amina, em DMF, com BOP e DIPEA à temperatura ambiente - Esquema 3.2.⁹



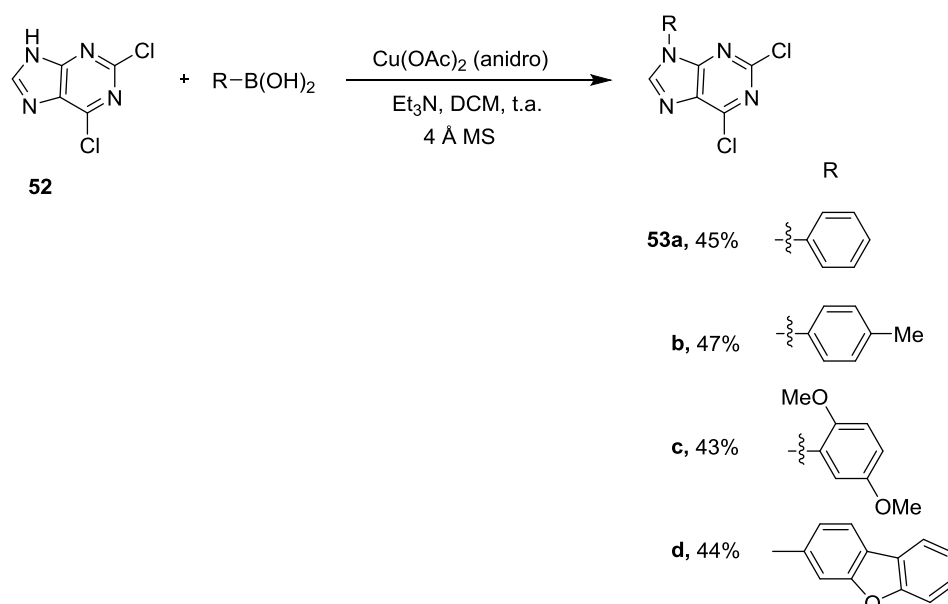
Esquema 3.2. Reação de funcionalização da posição 6 do anel de purina.

Adicionalmente, Huang *et al*¹⁰ geraram 6-aminopurinas **51** a partir da 6-cloropurina **50**. Esta reagiu com vários nucleófilos sob radiação micro-ondas. Os produtos finais foram isolados após alguns minutos, com bons rendimentos - Esquema 3.3.¹⁰



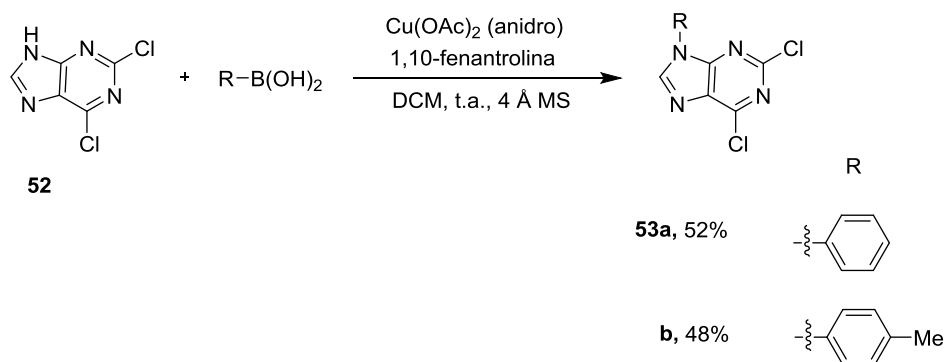
Esquema 3.3. Reação da 6-cloropurina **50** com várias aminas, para gerar as 6-aminopurinas **51**.

A introdução de grupos arilo em N₉ do anel de purina pode ser realizada recorrendo a vários métodos sintéticos. Porém, alguns desses métodos têm como problema a falta de regio-seletividade, uma vez que os grupos arilo são introduzidos quer na posição 7 quer na posição 9 do anel de purina.¹ Em 2001, Ding *et al*⁶ descreveram a introdução praticamente seletiva (>90%) de grupos arilo em N₉. Assim, como se pode observar no esquema 3.4, as 9-arilpurinas **53** foram obtidas através da reação da 2,6-dicloropurina **52** com os diferentes ácidos borónicos na presença de acetato de cobre anidro e trietilamina, em diclorometano.⁶



Esquema 3.4. Síntese das 9-arilpurinas **53** através da reação da 2,6-dicloropurina **52** com diferentes ácidos borónicos.

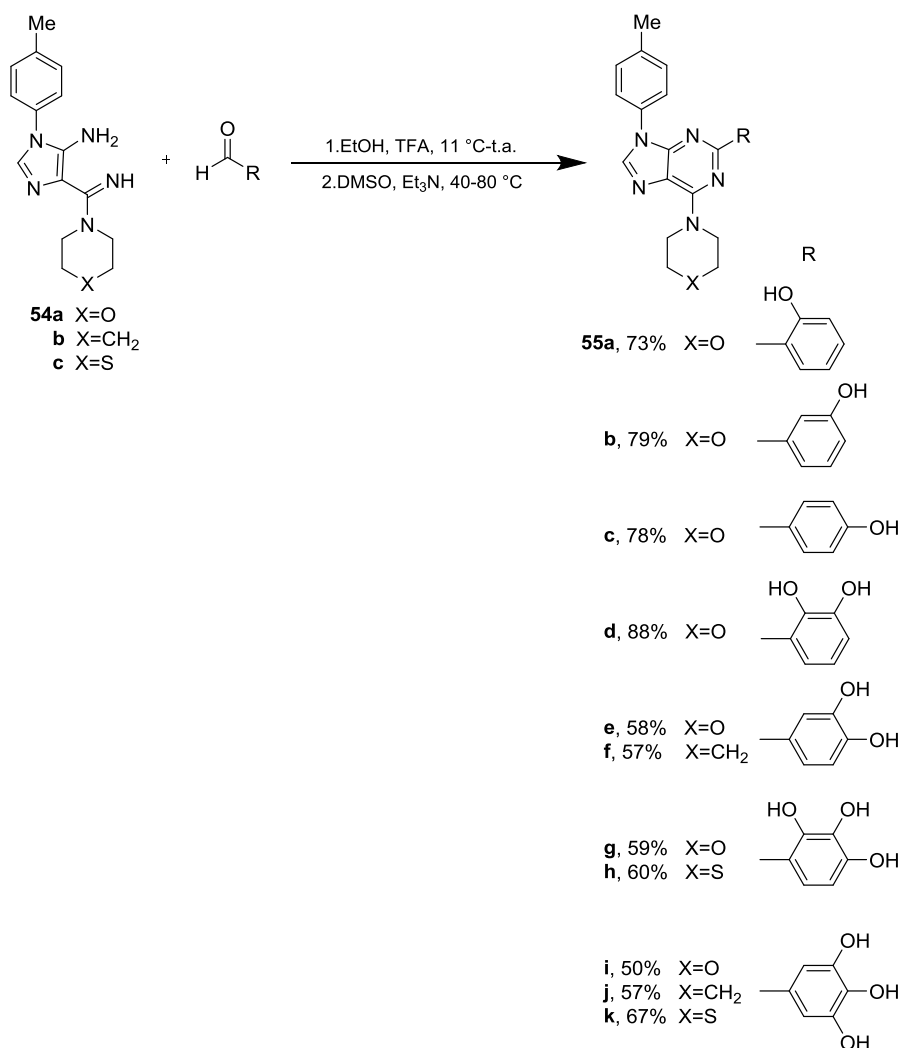
Mais tarde, Bakkestuen *et al*¹¹ utilizando condições idênticas, com exceção da base (a trietilamina foi substituída por 1,10-fenantrolina), introduziram seletivamente grupos arilo na posição 9 - Esquema 3.5.¹¹ Importa referir que, em ambos os métodos, os produtos foram isolados com rendimentos moderados.



Esquema 3.5. Reação da 2,6-dicloropurina **52** com diferentes ácidos borónicos, utilizando a 1,10-fenantrolina como base.

A obtenção de derivados de purina com base na modificação de purinas funcionalizadas é uma abordagem bastante dispendiosa, devido ao custo elevado dos reagentes.^{1,2} Neste sentido, no grupo de investigação, foi desenvolvida uma abordagem mais simples e económica que permite introduzir uma grande variedade de substituintes nas posições 2, 6 e 9 do anel de purina, a partir de imidazoles substituídos.¹²⁻²¹

Recentemente, Correia *et al*²² descreveram um método sintético que permite a introdução de unidades fenólicas em C_2 , através da reação dos 4-amidino-5-aminoimidazoles **54** com os respetivos aldeídos fenólicos, em catálise ácida e básica, gerando as purinas **55** como se pode observar no esquema 3.6.²²

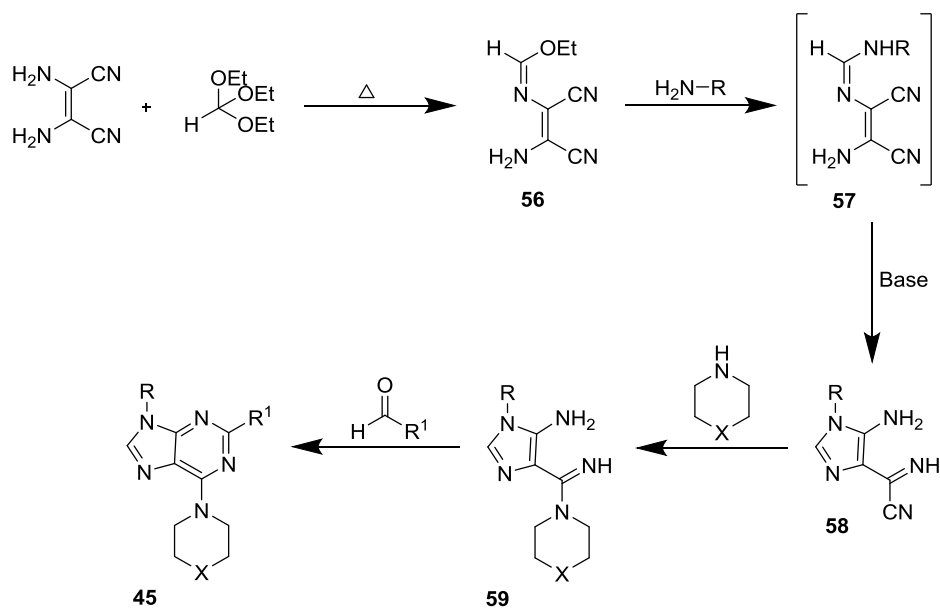


Esquema 3.6. Reação dos imidazoles **54** com vários aldeídos fenólicos, para originar as purinas **55**.

A abordagem sintética descrita anteriormente permite a introdução dos substituintes pretendidos neste trabalho nas posições 2, 6 e 9 do anel de purina. Desta forma, a abordagem de síntese utilizada foi desenvolvida tendo como base este método.

A abordagem sintética utilizada para a síntese dos compostos pretendidos encontra-se no esquema 3.7. Uma vez que os reagentes necessários para a síntese dos compostos **45**, não se encontram disponíveis comercialmente, o trabalho iniciou-se com a síntese dos reagentes de partida. Assim, a primeira etapa consistiu na síntese do imidato **56**, a partir de reagentes disponíveis comercialmente - o diaminomaleonitrilo e o ortoformiato de etilo.

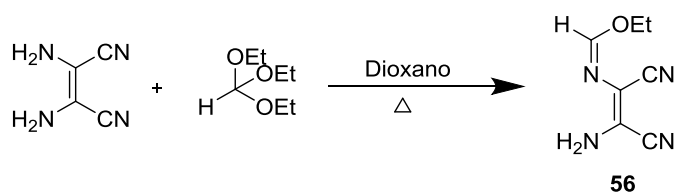
Posteriormente, o imidato **56** reagiu com a amina aromática, originando a amidina **57**. *In situ*, na presença de base, a amidina **57** ciclizou originando o imidazole **58**. O último reagente de partida, o imidazole **59**, foi obtido pela reação do imidazole **58** com a respectiva amina secundária. Por fim, os produtos **45** foram sintetizados através da reação do imidazole **59** com os respectivos aldeídos, primeiro em catálise ácida e, posteriormente em catálise básica.



Esquema 3.7. Abordagem sintética utilizada para a síntese dos compostos **45**.

3.1. Reagentes de partida

3.1.1. Síntese de imidato



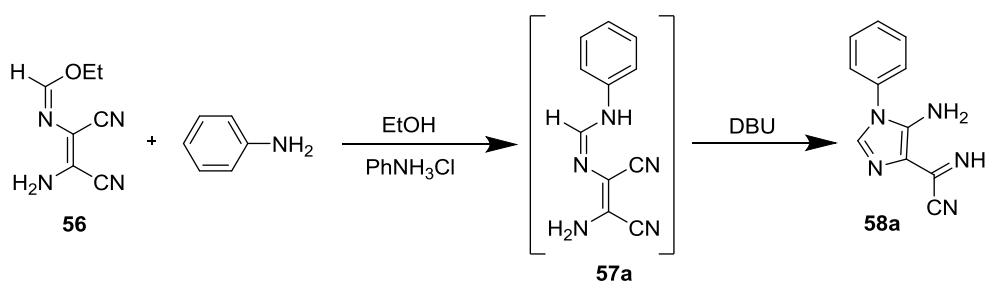
Esquema 3.8. Reação do DAMN com o ortoformiato de etila, para a obtenção do imidato **56**.

O imidato **56** é o primeiro intermediário do processo e foi sintetizado de acordo com o método descrito por Woodward.²³ Este foi obtido por reação do diaminomaleonitrilo (DAMN) com o ortoformiato de etila, sob refluxo (Esquema 3.8). Adicionalmente, utilizou-se o dioxano como solvente e acoplou-

se um sistema de destilação fracionada. O controlo da temperatura da reação é importante, uma vez que se esta ultrapassa os 120 °C, conduz à formação de um produto indesejado. Uma vez terminada a reação, a solução foi filtrada a quente para remover os resíduos negros. Posteriormente, foi adicionado N-hexano à mistura reacional e, precipitou um sólido branco. A suspensão foi filtrada sob vácuo e o sólido foi lavado com uma mistura de N-hexano:éter etílico (1:1). Recorrendo à técnica de TLC, o produto isolado foi identificado como sendo imidato **56**, por comparação com uma amostra de referência.

3.1.2. Síntese de 5-amino-4-cianoimidazoles

Resultados anteriores¹⁷ demonstraram que os 5-amino-4-cianoimidazoles **58** podem ser obtidos utilizando dois métodos distintos. O primeiro consiste na formação do imidazole **58** a partir da amidina **57**. No segundo método, o imidato **56** é convertido na amidina **57**, que por sua vez é diretamente convertida *in situ* no imidazole **58**.

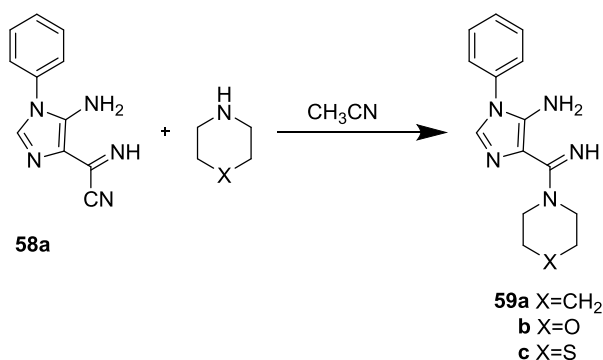


Esquema 3.9. Reação do imidato **56** com a anilina, com catálise ácida.

Neste trabalho, o imidazole **58a** foi obtido tendo por base o segundo método, ou seja, sem isolamento da amidina (Esquema 3.9). Assim, o imidato **56** reagiu com a anilina, em proporção equimolar, na presença de catálise ácida – cloreto de anilíneo – e, o etanol foi utilizado como solvente. Adicionalmente, as reações ocorreram sob atmosfera de nitrogénio, a 8 °C. Decorridas 18 horas, verificou-se a ausência do reagente de partida e, foi adicionado DBU à mistura reacional, que promoveu a ciclização intramolecular da amidina **57a**, originando o imidazole **58a**. As reações foram seguidas por TLC e, após 1 hora

estavam terminadas. O produto pretendido precipitou da mistura reacional e, foi isolado e lavado com etanol e éter etílico frios. Com base no TLC, o produto foi identificado como sendo o imidazole **58a**, por comparação com uma amostra de referência. No entanto, o rendimento das reações foi baixo (45-60%), o que pode ser justificado pela elevada solubilidade do produto na mistura reacional.

3.1.3. Síntese de 4-amidino-5-aminoimidazoles



Esquema 3.10. Reação do imidazole **58a** com aminas secundárias.

Recentemente, foi descrito um método²¹ para obter seletivamente os imidazoles **59a** e **59b** a partir do imidazole **58a**. Assim, com base neste método, foram sintetizados os imidazoles **59a** e **59b** e, as mesmas condições experimentais foram aplicadas para sintetizar o novo derivado **59c** (Esquema 3.10).

Os imidazoles **59a-c** foram sintetizados por reação do imidazole **58a** com um excesso da respetiva amina secundária (5 eq.), em acetonitrilo, sob atmosfera de nitrogénio a 8 °C. As reações foram seguidas por TLC e, o tempo de reação variou entre 5 e 72 horas. Os imidazoles **59a-c** precipitaram do meio reacional e foram isolados com bons rendimentos que variaram entre 75 e 80%. A solubilidade dos diferentes imidazoles **59a-c** contribuiu para as diferenças no rendimento. O imidazole **59a** é o mais solúvel na mistura reacional e como tal foi isolado com o menor rendimento.

Os produtos **59a** e **59b** foram identificados, com base no TLC, por comparação com uma amostra de referência. A estrutura do composto **59c** foi identificada como sendo 4-amidino-5-aminoimidazole através de ¹H RMN

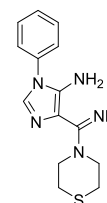
(Tabela 3.2), bem como recorrendo a outras técnicas analíticas e espectroscópicas (Tabela 3.1 e 3.2).

3.1.4. Caracterização analítica e espectroscópica de 4-amidino-5-aminoimidazole

3.1.4.1. Dados físicos e analíticos

Na tabela 3.1 está representado o rendimento da reação que originou o composto **59c**, bem como o seu ponto de fusão. Adicionalmente, encontram-se os valores obtidos da análise elementar e, a fórmula molecular para o imidazole **59c**, que apoiam a estrutura proposta.

Tabela 3.1. Dados físicos e analíticos para o composto **59c**.



Comp.	η (%)	p.f. (°C)	Fórmula Molecular	C; H; N; S (%) Valores obtidos (Calculados)
59c	75	169-171	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ S	58,32; 5,93; 24,11; 10,95 (58,51; 5,96; 24,37; 11,16)

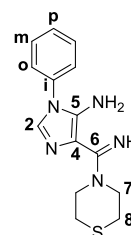
3.1.4.2. Espectroscopia de infravermelho, ¹H e ¹³C RMN

O espectro de IV do imidazole **59c** apresenta duas zonas características (Tabela 3.2). A primeira situa-se entre 3400 e 3000 cm⁻¹, onde se observam três bandas de intensidade média, típicas de estiramento das ligações N-H e das ligações C-H em anéis aromáticos.²⁴ Na segunda região situada entre 1700-1400 cm⁻¹, surgem bandas características das vibrações de estiramento das ligações C=N e C=C em anéis aromáticos, bem como da deformação angular das ligações N-H.²⁴

O espectro de ^1H RMN do composto **59c** apresenta um singlete correspondente ao H_2 a δ 7,39 ppm, desvio químico característico para esta classe de compostos.²¹ Adicionalmente, surgem dois singletos largos a δ 7,00 e 5,43 ppm, com integração para um e dois prótons correspondentes aos grupos NH e NH_2 , respetivamente.

Os prótons H_8 e H_7 surgem como multipletos a δ 2,63 e 3,65 ppm, respetivamente. Adicionalmente, destaca-se do espectro de ^1H RMN o multiplete a δ entre 7,42-7,57 ppm, correspondente aos prótons aromáticos. Os valores dos desvios químicos obtidos para o imidazole **59c** encontram-se na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Dados espectroscópicos de IV (Nujol/ cm^{-1}), de ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) e ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO-d_6) para o composto **59c**.



Comp.	IV	^1H	^{13}C
59c			26,28 (C_8)
	3346 (m)		48,87 (C_7)
	3288 (m)	2,63 (m, 4H, H_8)	115,22 (C_4)
	3111 (m,l)	3,65 (m, 4H, H_7)	124,72 (C_m)
	1623 (m)	5,43 (sl, 2H, NH_2)	127,96 (C_p)
	1588 (i)	7,00 (sl, 1H, NH)	129,75 (C_o)
	1517 (m)	7,39 (s, 1H, H_2)	130,00 (C_2)
	1495 (m)	7,42-7,57 (m, 5H,	134,95 (C_i)
	1418 (m)	$\text{H}_p + \text{H}_m + \text{H}_o$)	138,50 (C_5)
			162,83 (C_6)

Os dados espectroscópicos de ^{13}C RMN do composto **59c** encontram-se representados na tabela 3.2. A atribuição dos sinais baseou-se na análise dos espectros bidimensionais de HMQC e HMBC.

O espectro de HMQC permite observar a correlação entre os sinais de protão e carbono diretamente ligados. Assim, pela análise do espectro de HMQC, é possível atribuir o sinal a δ 130 ppm ao carbono 2, uma vez que este apresenta uma correlação com o singlete a δ 7,39 ppm, correspondente ao H₂. Foi ainda possível atribuir os sinais dos carbonos 7 e 8, bem como dos carbonos *orto*, *meta* e *para* do anel aromático.

O espectro de HMBC mostra correlações entre protões e carbonos a três ligações. A interação do H₂ com os carbonos 4 e 5, como representado na figura 3.1, permitiu as suas atribuições. Visto que o C₅ se encontra entre dois nitrogénios e o C₄ entre um nitrogénio e um carbono, o sinal a δ 138,50 ppm foi atribuído ao C₅ por este estar eletronicamente mais desprotegido. Por sua vez, o sinal a δ 115,22 ppm foi atribuído ao C₄. Por último, o desvio químico a δ 162,83 ppm foi atribuído ao carbono 6.

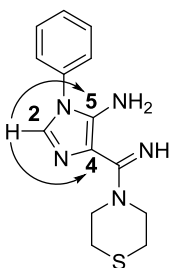
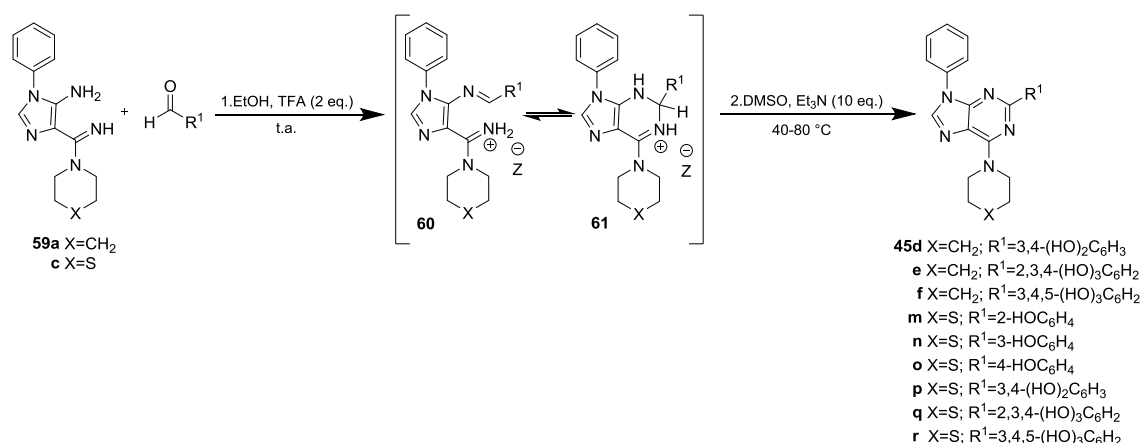


Figura 3.1. Interação pela técnica bidimensional de HMBC do protão H₂ com os carbonos 4 e 5, para o imidazole 59c.

3.2. 6-amino-9-arilpurinas

3.2.1. Síntese de 6-amino-2,9-diarilpurinas

Como já foi referido, recentemente foi descrito um método²² que permite a síntese de purinas com os grupos hidroxifenilo, amino e arilo nas posições 2, 6 e 9 do anel de purina, respetivamente. Desta forma, o procedimento descrito foi utilizado para a síntese dos novos compostos **45**.



Esquema 3.11. Reação dos imidazoles 59a e 59c com diferentes aldeídos fenólicos.

Os compostos **45** foram sintetizados, em dois passos, por reação dos imidazoles **59** com diferentes aldeídos fenólicos, reagente que foi utilizado em ligeiro excesso (1,1 eq.) – Esquema 3.11. Na primeira etapa foi utilizada uma pequena quantidade de etanol como solvente e um ligeiro excesso de TFA e, as reações ocorreram à temperatura ambiente sob agitação magnética. As condições utilizadas favorecem a condensação entre o imidazole **59** e o aldeído fenólico, levando à formação dos intermediários **60** e **61**, evidência no TLC por duas manchas distintas. A reação mais lenta foi a de formação do composto **45e**, que demorou 12 dias, enquanto as reações mais rápidas foram as que levaram à formação dos compostos **45m-o**, em que o tempo de reação foi de 18 horas. A diferença no tempo de reação pode ser justificada pela maior solubilidade dos aldeídos fenólicos utilizados para a obtenção dos compostos **45m-o**. Nesta fase, as misturas reacionais foram concentradas até à secura para eliminar o etanol. A segunda etapa da reação ocorreu na presença de DMSO e um excesso de Et₃N, sob agitação magnética a temperaturas que variaram entre os 40 e 80 °C. Estas condições favorecem a ciclização intramolecular da imina **60** para gerar dihidropurina (DHP) **61** e, por sua vez a oxidação desta originando as purinas **45**. As reações foram seguidas por TLC. Quando estavam terminadas, foram concentradas para eliminar a base. Os produtos foram precipitados por adição de água destilada fria. Os sólidos foram isolados após serem filtrados e lavados com água destilada fria. Com base em ¹H RMN, os produtos foram

identificados como sendo 6-amino-2,9-diarilpurinas **45**. No entanto, os compostos não se encontravam puros. Em todos os casos, com exceção do composto **45n**, foi possível observar dois conjuntos de sinais, no espectro de ^1H RMN. Um conjunto de sinais permitiu a identificação das purinas **45** e o outro conjunto de sinais demonstrou a presença de um segundo componente nas amostras.

Na tentativa de purificar os compostos **45d**, **45p** e **45q** recorreu-se à cromatografia em *flash* seca utilizando como eluente DCM/MeOH (30:1). Os compostos precipitaram após a adição de metanol e água destilada frios. No entanto, no espectro de ^1H RMN dos sólidos resultantes da purificação, foi possível constatar a presença do contaminante anteriormente detetado, indicando que as condições de purificação não foram eficientes.

A obtenção das purinas **45** com um elevado grau de pureza é essencial para avaliar a sua atividade antifúngica. Assim, tentou identificar-se o contaminante presente nas amostras na tentativa de estabelecer um procedimento de purificação eficiente para os compostos **45**.

A estrutura atribuída ao contaminante encontra-se na figura 3.2 e, foi proposta com base no espectro de ^1H RMN. Este apresenta um singlete a δ aproximadamente 8,60 ppm, deslocamento químico típico do protão H₈ do anel de purina. O outro singlete a δ aproximadamente 8,25 ppm é característico de 6-aminopurinas com um protão em C₂, anteriormente sintetizadas no grupo de investigação.²⁰ Posteriormente, procedeu-se à síntese destes derivados de purina, de acordo com o método descrito por Alves *et al*²⁰ e, confirmou-se, assim, a estrutura inicialmente proposta para o contaminante.

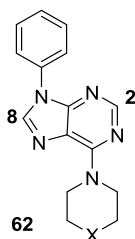
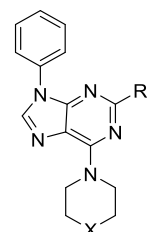


Figura 3.2. Estrutura do contaminante formado na reação dos imidazoles **59** com os aldeídos fenólicos.

Após confirmação da estrutura do contaminante, calculou-se a proporção dos produtos presentes nas amostras isoladas, com base nos sinais do espectro de ^1H RMN. Os valores encontram-se representados na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Proporção relativa entre os dois produtos obtidos (45:62).



R ¹ ↓ \ X →		CH ₂		S	
2-HOC ₆ H ₄	H	-		45m	91:9
3-HOC ₆ H ₄	H	-		45n	100:0
4-HOC ₆ H ₄	H	-		45o	82:18
3,4-(HO) ₂ C ₆ H ₃	H	45d	80:20 90:10 ^a	45p	70:30 75:25 ^a
2,3,4-(HO) ₃ C ₆ H ₂	H	45e	70:30	45q	79:21 83:17 ^a
3,4,5-(HO) ₃ C ₆ H ₂	H	45f	87:13	45r	95:5

^a Condições reacionais controladas

Pela análise da tabela 3.3, é possível constatar que a proporção dos dois produtos não é influenciada pelo grupo amino na posição 6 do anel de purina, bem como pelo número de grupos hidroxilo no substituinte R¹. Porém, salienta-se que a presença de grupos hidroxilo na posição *orto* e/ou *para* conduz à formação do contaminante, enquanto que para o composto **45n** com o substituinte R¹=3-HOC₆H₄ não se verificou a formação do contaminante.

Considerando que a presença de base favorece a formação da purina **45** e, que as reações ocorreram a temperaturas elevadas, a formação do segundo produto pode estar relacionada com a perda de Et₃N da mistura reacional. Após a análise cuidadosa das condições reacionais utilizadas e identificados os

problemas, a síntese dos compostos **45d**, **45p** e **45q** foi repetida e, as condições reacionais foram controladas, diminuindo a perda da base. Pela análise da tabela 3.3, verifica-se que a quantidade de contaminante obtido nestas condições é menor. Assim, pode concluir-se que a quantidade de base presente na mistura reacional influencia a percentagem de contaminante formado nas reações.

Com o intuito de compreender o processo de formação da purina não fenólica **62**, foi realizado um estudo por ^1H RMN. Uma amostra de imidazole **59a** foi colocada em etanol, na presença de 2,3,4-trihidroxibenzaldeído e TFA. Após 24 horas à temperatura ambiente, o resíduo foi dissolvido em DMSO- d_6 e analisado por ^1H RMN, que revelou a existência de imina **60** e DHP **61**, na proporção 9:1. O tubo de RMN permaneceu 3 horas à temperatura ambiente e, a composição da mistura manteve-se praticamente inalterada. Adicionou-se então uma gota de Et_3N e obteve-se novo espectro. As proporções de **60:61** passaram para 3:1 e não se alteraram durante 1 hora. De modo a reproduzir as condições reacionais utilizadas na síntese das purinas **45**, colocou-se o tubo de RMN num banho a 40 °C, durante 30 minutos. O espectro obtido em seguida mostrou o aparecimento dos sinais correspondentes às purinas **45** e **62**. Após 18 horas, a percentagem de purina **45** e **62** tinha aumentado ligeiramente. Posteriormente, colocou-se o tubo de RMN num banho a 80 °C durante 2 dias. O espectro mostrou que a reação estava terminada com 75% da purina **45** e 25% da purina **62**.

Com base neste estudo, foi possível concluir que a adição da base à mistura reacional contribui para deslocar o equilíbrio no sentido da formação da DHP **60**. Além disso, à temperatura ambiente, não se observa evolução da DHP **60** para a purina **45**. De facto, elevadas temperaturas favorecem a formação da purina **45**. No entanto, o aquecimento também leva à formação da purina não fenólica **62**, independentemente da temperatura utilizada.

A abordagem utilizada neste trabalho para a síntese das purinas fenólicas **45** conduz à contaminação do produto pretendido com um subproduto formado, a purina não fenólica **62**, bem como à elevada degradação

da mistura reacional. No entanto, este método é a abordagem sintética reportada para obter este tipo de compostos.²² Desta forma, foi necessário estabelecer um método de purificação que permitisse a obtenção dos produtos com um grau de pureza adequado. Estudos anteriores²⁵ revelaram que a cromatografia em *flash* seca é o método de purificação mais indicado para este tipo de compostos. No entanto, as duas purinas obtidas têm um fator de retenção (Rf) muito idêntico, tornando a sua separação muito complicada. Na tentativa de obter um método de purificação, estudou-se a solubilidade das purinas **62** em diferentes solventes e, verificou-se que estas eram solúveis em éter etílico.

Desta forma, a abordagem encontrada para a purificação dos compostos **45** foi a combinação da cromatografia em *flash* seca seguindo-se a recristalização seletiva do produto pretendido. Assim, os compostos **45d-f** e **45m-r** foram purificados recorrendo à cromatografia em *flash* seca utilizando éter etílico como eluente. A quantidade de éter etílico variou consoante o Rf das purinas **45**. Os produtos precipitaram da mistura reacional e, foram isolados e lavados com éter etílico frio. Por ¹H RMN, foi possível constatar que os sólidos isolados continham apenas a purina **45**, sendo possível concluir que o método de purificação utilizado é o mais indicado. Os novos derivados de purina **45** foram totalmente caracterizadas com base nas técnicas espectroscópicas de IV (Tabela 3.5), ¹H RMN (Tabela 3.6) e ¹³C RMN (Tabela 3.7), bem como por ponto de fusão e análise elementar (Tabela 3.4).

O espectro de ¹H RMN do composto **45r**, após a *flash* seca revelou a existência da purina fenólica e de outro componente, na proporção 7:3. O procedimento experimental para a síntese e purificação dos compostos **45m-r** foi semelhante. No entanto, o composto **45r** foi obtido após precipitação lenta à temperatura ambiente enquanto que todos os outros compostos precipitaram rapidamente da solução resultante da *flash* seca. Estes dados parecem indicar que presença/ausência do outro contaminante nos sólidos isolados pode estar relacionada com o método de isolamento destes.

Na tentativa de identificar o componente adicional na amostra do composto **45r** obteve-se o espectro de ^{13}C RMN e, verificou-se que, como no espectro de ^1H RMN, todos os sinais estavam duplicados (Tabela 3.7). Este facto sugere que os dois componentes da amostra são tautómeros. Além disso, após aquecimento da amostra, verificou-se, no espectro de ^1H RMN, que os sinais a δ 4,26 e 5,26 ppm sofreram um deslocamento do sentido do sinal principal a δ 4,62 ppm, correspondente aos H_{10} (Tabela 3.6). Esta evidência apoia a hipótese da existência de dois tautómeros e, demonstra que pode ocorrer conversão entre eles.

As estruturas propostas para os dois tautómeros encontram-se representadas na figura 3.3. Na estrutura proposta para o tautómero B, verifica-se que o nitrogénio da amina secundária ligada ao C_6 encontra-se protonado, podendo assim estabelecer uma ligação de hidrogénio intramolecular com o nitrogénio N_7 do anel de purina. Desta forma, a rotação em torno da ligação entre o carbono 6 e o nitrogénio da amina secundária é mais difícil. Os quatro protões correspondentes aos H_{10} tornam-se quimicamente diferentes e originam dois sinais, ambos com integração para dois protões, no espectro de ^1H RMN, sendo que o mesmo se verifica com os H_{11} .

No entanto, não foi possível realizar análise elementar ou espectrometria de massa de alta resolução para obter a confirmação de que os componentes presentes na amostra são tautómeros.

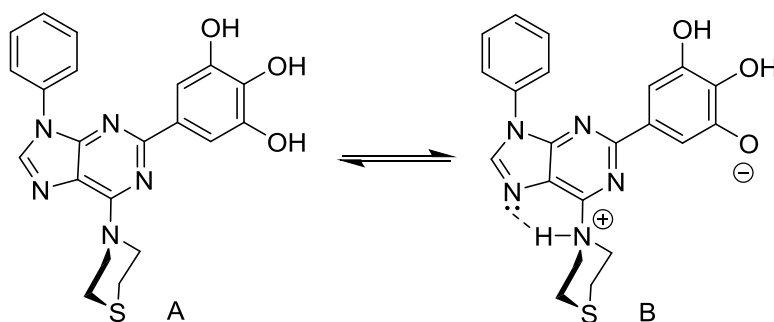
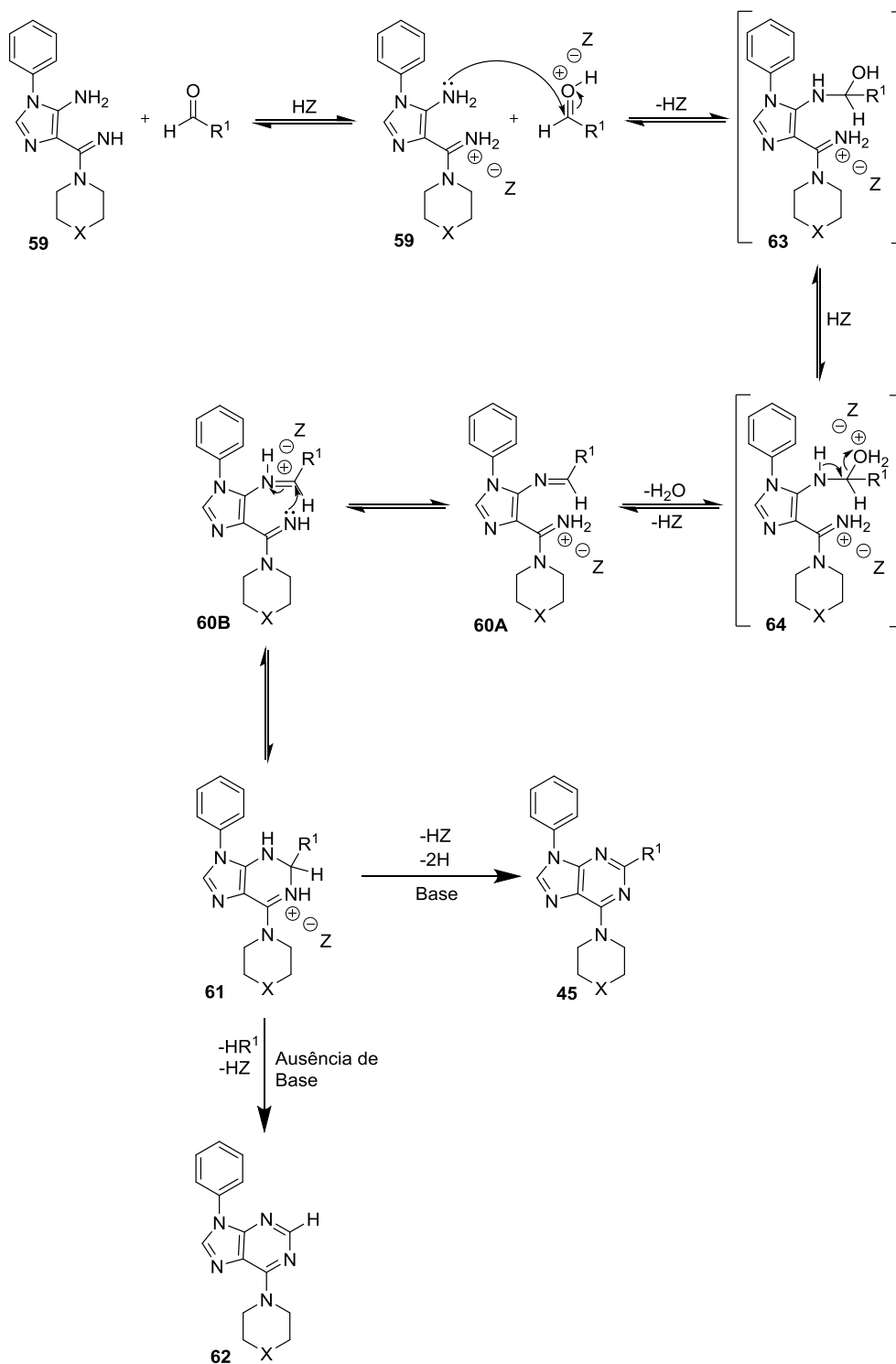


Figura 3.3. Estrutura proposta para os dois tautómeros presentes na amostra do composto **45r**. Os tautómeros A e B estão presentes na proporção 7:3.

3.2.2. Mecanismo da reação

Tendo em conta os dados disponíveis, a proposta de mecanismo para a formação da purina fenólica **45** bem como da purina não fenólica **62** encontra-se representada no esquema 3.12.

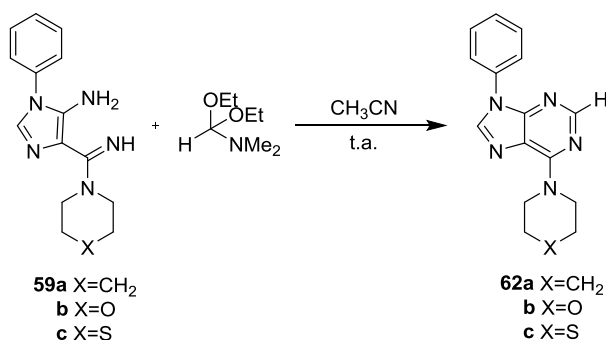
A reação do imidazole **59** com o aldeído fenólico inicia-se em meio ácido. Nestas condições, a função amidina do imidazole **59** encontra-se protonada bem como o oxigénio do grupo carbonilo, ativando assim o carbono carbonílico. O ataque nucleofílico do nitrogénio do grupo amina ao carbono do aldeído gera o intermediário **63**. Após eliminação de uma molécula de água, o intermediário **64** origina a imina **60**, que pode existir na forma de dois tautómeros (A e B). A partir do tautómero B, ocorre a ciclização intramolecular da imina **60** através do ataque nucleofílico do nitrogénio da função amidina ao carbono imínico gerando assim a DHP **61**. Por último, na presença de base e calor, a DHP **61** é oxidada, perdendo dois átomos de hidrogénio, originando a purina **45**. No entanto, quando a quantidade de base é mais reduzida, a DHP **61** pode ser convertida na purina **62** pela eliminação do grupo HR¹.



Esquema 3.12. Proposta mecanística para a reação dos imidazóis 59 com aldeídos fenólicos.

3.2.3. Síntese de 6-amino-9-arylpurinas com protão em C₂

Tal como foi referido anteriormente, a reação dos 4-amidino-5-aminoimidazoles **59** com aldeídos fenólicos originou um subproduto identificado como a purina **62**. No entanto, a sua estrutura só foi confirmada após se ter procedido à sua síntese. Os compostos **62** foram sintetizados de acordo com o método descrito por Alves *et al*²⁰.



Esquema 3.13. Reação dos imidazoles **59** com *N,N*-dimetilformamida dietil acetal.

As purinas **62** foram geradas por reação dos imidazoles **59** com a *N,N*-dimetilformamida dietil acetal, reagente utilizado em ligeiro excesso (2 eq.) – Esquema 3.13. As reações foram realizadas à temperatura ambiente e, foi utilizado acetonitrilo como solvente. As reações foram seguidas por TLC e, o tempo de reação variou entre 1 e 9 dias, consoante o imidazole **59** utilizado. Posteriormente, a mistura reacional foi concentrada até à secura e o resíduo dissolvido em THF e filtrado numa coluna de sílica com 0,5 cm de altura e, que foi lavada com éter etílico. A solução resultante foi concentrada quase até à secura e, o produto foi precipitado com uma mistura de éter etílico e *N*-hexano a baixas temperaturas. Os compostos foram isolados com rendimentos razoáveis a bons (67-81%), dependendo da solubilidade do produto. A estrutura dos compostos **62** foi confirmada, com base na análise elementar (Tabela 3.4), no IV (Tabela 3.5), no ¹H RMN (Tabela 3.6) e ¹³C RMN (Tabela 3.7).

3.2.4. Caracterização analítica e espectroscópica de 6-amino-9-aryl-purinas

3.2.4.1. Dados físicos e analíticos

Na tabela 3.4 encontram-se representados os rendimentos das reações que deram origem aos compostos **45** e **62**, bem como os seus pontos de fusão. Adicionalmente, não foi possível obter análise elementar dos compostos **45m**, **45n**, **45p-r**, **62a** e **62b**.

Os dados analíticos das purinas **45** e **62** apoiam a fórmula empírica dos compostos, contudo estes encontram-se na forma hidratada. Importa referir que o composto **45f** foi cristalizado de éter etílico, daí a presença deste solvente na sua estrutura.

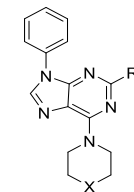
3.2.4.2. Espectroscopia de infravermelho

No espectro de IV das purinas **45** surge uma a três bandas de intensidade média ou intensa na zona 3600-3000 cm⁻¹, atribuídas às vibrações de estiramento da ligação O-H.²⁴ Algumas destas bandas são largas devido às pontes de hidrogénio formadas intra e intermolecularmente pelos grupos hidroxilo. A banda correspondente a vibração de estiramento C-H em anéis aromáticos é visível próximo dos 3050 cm⁻¹ para os compostos **45n** e **62a-c**.²⁴ Na região situada entre 1800-1400 cm⁻¹, surgem bandas características das vibrações de estiramento das ligações C=N e C=C em anéis aromáticos.²⁴ Os valores das bandas observadas encontram-se na tabela 3.5.

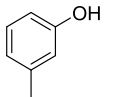
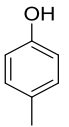
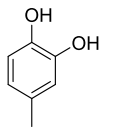
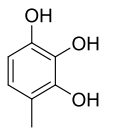
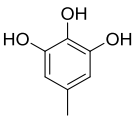
3.2.4.3. Espectroscopia de ¹H RMN

Os espectros de ¹H RMN das 6-amino-9-aryl-purinas **45** e **62**, apresentam um singlete bem definido no intervalo δ 8,48-8,62 ppm correspondente ao H₈ (Tabela 3.6). Relativamente aos compostos **62**, observa-se ainda um singlete a δ aproximadamente 8,30 ppm atribuído ao protão C₂-H. Estes protões encontram-se eletronicamente muito desprotegidos porque estão inseridos no anel de purina, originando sinais a campo baixo.

Tabela 3.4. Dados físicos e analíticos para os compostos 45 e 62.



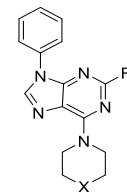
Comp.	X	R ¹	η (%)	p.f. (°C)	Fórmula Molecular	C; H; N; S (%) Valores obtidos (Calculados)
45d	CH ₂		38	249-251	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₂ .0,4H ₂ O	66,97; 5,40; 17,76 (66,96; 5,57; 17,75)
45e			10	219-221	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₃ .0,2H ₂ O	64,96; 5,14; 17,20 (64,92; 5,30; 17,21)
45f			42	166-168	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₃ .0,3H ₂ O.0,5O(Et) ₂	64,68; 5,83; 15,63 (64,65; 6,01; 15,71)
45m	S		16	186-188	C ₂₁ H ₁₉ N ₅ OS	a)

45n			46	218-220	$C_{21}H_{19}N_5OS$	a)
45o			37	259-261	$C_{21}H_{19}N_5OS \cdot 0,45H_2O$	63,72; 4,83; 17,38; 7,78 (63,44; 5,05; 17,62; 8,06)
45p			22	264-266	$C_{21}H_{19}N_5O_2S$	a)
45q			5	256-258	$C_{21}H_{19}N_5O_3S$	a)
45r			6	207-209	$C_{21}H_{19}N_5O_3S$	a)
62a	CH ₂	H	67	86-88	$C_{16}H_{17}N_5$	a)
62b	O		81	161-163	$C_{15}H_{15}N_5O$	a)

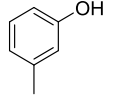
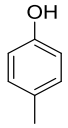
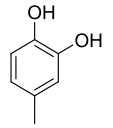
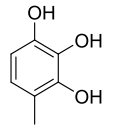
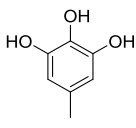
62c	S		81	136-138	$C_{15}H_{15}N_5S \cdot 0,04H_2O$	60,70; 5,15; 23,24; 10,44 (60,44; 5,10; 23,49; 10,75)
------------	---	--	----	---------	-----------------------------------	--

a) O resultado da análise elementar ainda não é conhecido.

Tabela 3.5. Dados espectroscópicos de IV (Nujol/cm⁻¹) para os compostos 45 e 62.



Comp.	X	R ¹	3600-3000	1800-1400
45d	CH ₂		3528 (i)	1576 (i), 1519 (m), 1493 (m), 1417 (i)
45e			3584 (m), 3526 (m), 3133 (m)	1619 (m), 1587 (m), 1515 (f)
45f			3447 (i,l), 3121 (i)	1693 (f), 1672 (f), 1574 (i), 1534 (i), 1416 (i)
45m	S		3115 (m)	1708 (f), 1592 (m), 1563 (m)

45n			3225 (i,l), 3116 (i), 3066 (i)	1693 (f), 1564 (i), 1516 (i), 1495 (i), 1410 (i)
45o			3120 (i,l)	1596 (i), 1564 (i), 1521 (m), 1493 (m), 1415 (i)
45p			3548 (i), 3480 (i,l)	1577 (i), 1516 (m), 1496 (m), 1415 (i)
45q			3462 (i,l)	1619 (m), 1579 (i), 1495 (m), 1412 (m)
45r			3407 (m,l), 3131 (m)	1576 (m), 1530 (m), 1495 (f), 1417 (m)
62a	CH ₂	H	3117 (m), 3067 (m), 3023 (m)	1735 (f), 1586 (i), 1563 (m), 1515 (f), 1502 (m)
62b	O		3082 (m)	1705 (f), 1594 (i), 1579 (i), 1556 (m), 1518 (m), 1500 (m), 1424 (f)

62c	S		3123 (m), 3067 (m), 3024 (m)	1730 (f), 1583 (i), 1564 (i), 1515 (m), 1500 (i), 1422 (m)
-----	---	--	------------------------------	---

A corrente de anel resultante da aromaticidade da estrutura de purina desloca os prótons H_{10} para campos mais baixos, relativamente aos H_{11} , originando um singlete largo a δ entre 4,22-4,62 ppm.

Os prótons dos substituintes aromáticos em N_9 e C_2 possuem desvios químicos a δ entre 7,46–7,94 e 6,36–13,64 ppm, respetivamente. Salienta-se que nos compostos **45e**, **45m** e **45q**, o grupo hidroxilo na posição *orto* surge como um singlete com um desvio químico a δ superior a 13 ppm, demonstrando a existência de uma ponte de hidrogénio intramolecular com o N_1 ou N_3 , como representado na figura 3.4.

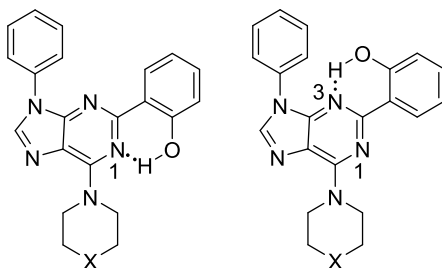


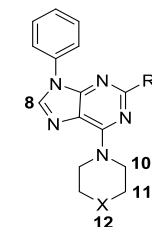
Figura 3.4. Ponte de hidrogénio intramolecular para as 6-amino-2,9-diarilpurinas, formada entre o próton do grupo hidroxilo na posição *orto* e o N_1 ou N_3 .



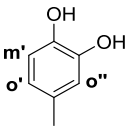
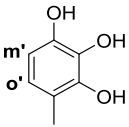
3.2.4.4. Espectroscopia de ^{13}C RMN

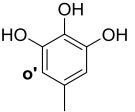
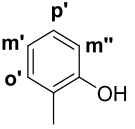
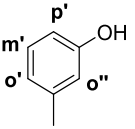
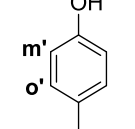
A atribuição dos sinais dos espectros de ^{13}C RMN baseou-se na análise dos espectros bidimensionais de HMQC e HMBC.

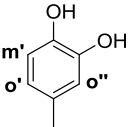
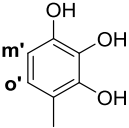
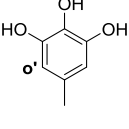
O espectro de HMQC das purinas **45** e **62** mostra o acoplamento direto entre o próton $C_8\text{-H}$ e o C_8 , permitindo assim a atribuição do sinal a δ entre 138,33-139,65 ppm ao carbono 8 do anel de purina. Adicionalmente, no espectro das purinas **62**, é possível atribuir o sinal a δ aproximadamente 152 ppm ao carbono 2, uma vez que este apresenta uma correlação com o singlete a δ aproximadamente 8,30 ppm, correspondente ao H_2 . Com base no espectro de HMQC, atribuiu-se ainda os sinais dos carbonos 10, 11 e 12. Além disso, o espectro de HMQC mostrou o acoplamento direto entre os prótons $C_{sp^2}\text{-H}$ e os correspondentes carbonos aromáticos (Tabela 3.7).

Tabela 3.6. Dados espectroscópicos de ^1H RMN (300^a) ou 400^b) MHz, DMSO- d_6) para os compostos 45 e 62.



Comp.	X	R ¹	H ₈			R ¹
45d ^a	CH ₂ 12		8,50 (s, 1H)	7,47 (t, 1H, 7.8 Hz, H _p) 7,63 (t, 2H, 7.8 Hz, H _m) 7,94 (d, 2H, 7.8 Hz, H _o)	1,65 (m, 6H, H ₁₁ + H ₁₂) 4,30 (sl, 4H, H ₁₀)	6,78 (d, 1H, 8.1 Hz, H _m) 7,69 (dd, 1H, 8.1/2.1 Hz, H _o) 7,80 (d, 1H, 2.1 Hz, H _{o'}) 9,04 (sl, 1H, OH _{m'}) 9,17 (sl, 1H, OH _{p'})
45e ^a			8,49 (s, 1H)	7,50 (t, 1H, 7.2 Hz, H _p) 7,61-7,69 (m, 3H, H _m + H _o) 7,80 (d, 2H, 7.2 Hz, H _o)	1,70 (m, 6H, H ₁₁ + H ₁₂) 4,27 (sl, 4H, H ₁₀)	6,36 (d, 1H, 9.0 Hz, H _m) 7,61-7,69 (m, 3H, H _m + H _o) 8,23 (s, 1H, OH _{m'}) 9,16 (s, 1H, OH _{p'}) 13,64 (s, 1H, OH _{o'})

45f^a			8,48 (s, 1H)	7,48 (t, 1H, 7.5 Hz, H _p) 7,63 (t, 2H, 7.5 Hz, H _m) 7,92 (d, 2H, 7.5 Hz, H _o)	1,65 (m, 6H, H ₁₁ + H ₁₂) 4,30 (sl, 4H, H ₁₀)	7,37 (s, 1H, H _o) 8,40 (s, 1H, OH _{p'}) 8,93 (s, 2H, OH _{m'})
45m^b	S		8,60 (s, 1H)	7,54 (t, 1H, 7.6 Hz, H _p) 7,66 (t, 2H, 7.6 Hz, H _m) 7,80 (d, 2H, 7.6 Hz, H _o)	2,80 (m, 4H, H ₁₁) 4,59 (sl, 4H, H ₁₀)	6,86 (dd, 1H, 8.0/1.2 Hz, H _{m'}) 6,90 (dt, 1H, 8.0/1.2 Hz, H _{m'}) 7,31 (dt, 1H, 8.0/1.6 Hz, H _{p'}) 8,32 (dd, 1H, 8.0/1.6 Hz, H _{o'}) 13,29 (s, 1H, OH)
45n^a			8,60 (s, 1H)	7,48 (t, 1H, 7.5 Hz, H _p) 7,64 (t, 2H, 7.5 Hz, H _m) 7,94 (d, 2H, 7.5 Hz, H _o)	2,77 (m, 4H, H ₁₁) 4,61 (sl, 4H, H ₁₀)	6,81-6,85 (m, 1H, H _{p'}) 7,25 (t, 1H, 7.8 Hz, H _{m'}) 7,77-7,80 (m, 2H, H _{o'} + H _{o''}) 9,50 (s, 1H, OH)
45o^a			8,56 (s, 1H)	7,47 (t, 1H, 7.8 Hz, H _p) 7,63 (t, 2H, 7.8 Hz, H _m) 7,94 (d, 2H, 7.8 Hz, H _o)	2,76 (m, 4H, H ₁₁) 4,60 (sl, 4H, H ₁₀)	6,83 (d, 2H, 6.9 Hz, H _{m'}) 8,19 (d, 2H, 6.9 Hz, H _{o'}) 9,80 (s, 1H, OH)

45p^{b)}			8,52 (s, 1H)	7,47 (t, 1H, 7.6 Hz, H _p) 7,62 (t, 2H, 7.6 Hz, H _m) 7,92 (d, 2H, 7.6 Hz, H _o)	2,75 (m, 4H, H ₁₁) 4,59 (sl, 4H, H ₁₀)	6,79 (d, 1H, 8.4 Hz, H _{m'}) 7,68 (dd, 1H, 8.4/2.0 Hz, H _{o'}) 7,78 (d, 1H, 2.0 Hz, H _{o''}) 9,07 (sl, 1H, OH _{m'}) 9,25 (sl, 1H, OH _{p'})
45q^{a)}			8,53 (s, 1H)	7,53 (t, 1H, 7.2 Hz, H _p) 7,62-7,69 (m, 3H, H _m + H _{o'}) 7,78 (d, 2H, 7.2 Hz, H _o)	2,79 (m, 4H, H ₁₁) 4,58 (sl, 4H, H ₁₀)	6,36 (d, 1H, 8.4 Hz, H _{m'}) 7,62-7,69 (m, 3H, H _m + H _{o'}) 8,25 (s, 1H, OH _{m''}) 9,19 (s, 1H, OH _{p'}) 13,41 (s, 1H, OH _{o'})
45rA^{b)}			8,54 (s, 1H)	7,50 (t, 1H, 7.6 Hz, H _p) 7,65 (t, 2H, 7.6 Hz, H _m) 7,94 (d, 2H, 7.6 Hz, H _o)	2,78 (m, 4H, H ₁₁) 4,62 (sl, 4H, H ₁₀)	7,37 (s, 1H, H _{o'}) 8,43 (s, <1H, OH _{p'}) 8,95 (s, <2H, OH _{m'})
45rB^{b)}			8,59 (s, 1H)	7,50 (t, 1H, 7.6 Hz, H _p) 7,65 (t, 2H, 7.6 Hz, H _m) 7,94 (d, 2H, 7.6 Hz, H _o)	2,89 (m, 2H, H ₁₁) 3,08 (m, 2H, H ₁₁) 4,26 (sl, 2H, H ₁₀) 5,26 (sl, 2H, H ₁₀)	7,39 (s, 1H, H _{o'}) 8,46 (s, <1H, OH _{p'}) 8,96 (s, <2H, OH _{m'})
62a^{a)}	CH ₂ 12	H	8,54 (s, 1H)	7,44 (t, 1H, 7.2 Hz, H _p) 7,58 (t, 2H, 7.2 Hz, H _m) 7,84 (d, 2H, 7.2 Hz, H _o)	1,60 (m, 4H, H ₁₁) 1,67 (m, 2H, H ₁₂) 4,22 (sl, 4H, H ₁₀)	8,25 (s, 1H)

62b^{a)}	O		8,60 (s, 1H)	7,46 (t, 1H, 7.2 Hz, H _p) 7,59 (t, 2H, 7.2 Hz, H _m) 7,84 (d, 2H, 7.2 Hz, H _o)	3,73 (m, 4H, H ₁₁) 4,24 (sl, 4H, H ₁₀)	8,30 (s, 1H)
62c^{a)}	S		8,62 (s, 1H)	7,46 (t, 1H, 7.2 Hz, H _p) 7,59 (t, 2H, 7.2 Hz, H _m) 7,84 (d, 2H, 7.2 Hz, H _o)	2,72 (m, 4H, H ₁₁) 4,54 (sl, 4H, H ₁₀)	8,32 (s, 1H)

A:B – Dois componentes presentes na amostra, na proporção relativa de 7:3.

No espectro de HMBC das purinas **45** e **62** é possível observar o acoplamento a três ligações entre o H₈ e os carbonos 4 e 5 do anel de purina, como está representado na figura 3.5A. O desvio químico a δ entre 148,80-151,66 ppm foi atribuído ao C₄, uma vez que este se encontra eletronicamente mais desprotegido. Por sua vez, o C₅ apresenta um sinal a δ entre 117,45-119,62 ppm. Para os compostos **62**, o HMBC revelou a interação do singlete correspondente ao H₂ com dois sinais a δ aproximadamente 150 e 153 ppm. Assim, foi possível confirmar a atribuição feita ao C₄ bem como atribuir o desvio químico ao C₆ (Figura 3.5B).

Por outro lado, observa-se o acoplamento entre o protão *orto* do anel fenólico das purinas **45** e um sinal a δ 157,65-158,98 ppm, identificando o carbono 2 do anel de purina (Figura 3.5C). Adicionalmente, no espectro de HMBC dos compostos **45**, não se observa qualquer acoplamento com o sinal a δ entre 152,38-153,01 ppm, permitindo assim a identificação do carbono 6 do anel de purina.

Os protões *meta* do grupo fenilo na posição 9 acoplam a três ligações com o C_i, permitindo assim a sua atribuição (Figura 3.5D). Analogamente, o C_{i'} foi identificado com base no acoplamento com o protão *meta* do anel fenólico (Figura 3.5D).

Por vezes, a técnica de HMBC mostra correlações entre protões e carbonos a duas ligações. Desta forma, os carbonos diretamente ligados aos grupos hidroxilo foram identificados através do acoplamento com o protão do grupo HO, a duas ligações (Figura 3.5E).

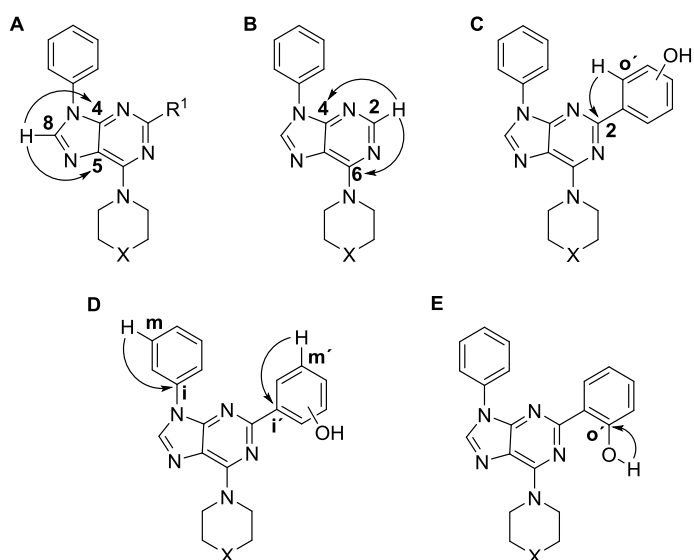
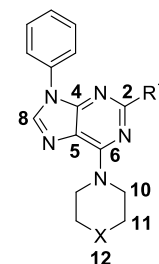
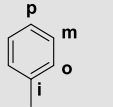
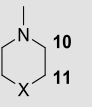
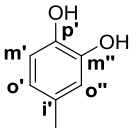
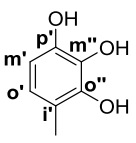
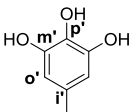
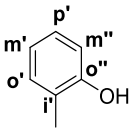


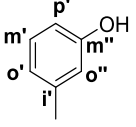
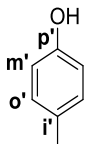
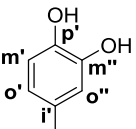
Figura 3.5. Interação pela técnica bidimensional de HMBC dos prótons das 6-amino-9-arylpurinas 45 e 62 com os carbonos vizinhos.

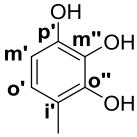
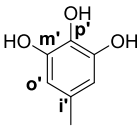
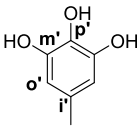
Tabela 3.7. Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN (75^a) e 100^b) MHz, DMSO-d₆) dos compostos 45 e 62.



Comp.	X	R ¹	C ₂	C ₄	C ₅	C ₆	C ₈			R ¹
45d ^a)	CH ₂ 12		157,97	151,41	117,94	153,01	138,33	123,29 (C _o) 127,40 (C _p) 129,51 (C _m) 135,28 (C _i)	24,37 (C ₁₂) 25,75 (C ₁₁) 45,61 (C ₁₀)	115,22 (C _{o''}) 115,26 (C _{m'}) 119,67 (C _{o'}) 129,76 (C _{i'}) 144,76 (C _{m''}) 147,40 (C _{p'})

45e^a			158,98	149,06	117,45	152,38	138,77	123,92 (C _o) 128,10 (C _p) 129,80 (C _m) 134,67 (C _i)	24,16 (C ₁₂) 25,71 (C ₁₁) 46,30 (C ₁₀)	107,05 (C _{m'}) 111,65 (C _{i'}) 119,36 (C _{o'}) 132,69 (C _{m''}) 148,48 (C _{p'}) 149,41 (C _{o''})
45f^a			158,13	151,47	117,92	152,96	138,35	123,41 (C _o) 127,45 (C _p) 129,52 (C _m) 135,30 (C _i)	24,40 (C ₁₂) 25,78 (C ₁₁) 45,63 (l, C ₁₀)	107,22 (C _{o'}) 128,67 (C _{i'}) 135,41 (C _{p'}) 145,48 (C _{m'})
45m^b	S		158,05	148,80	118,25	152,41	139,65	123,84 (C _o) 128,26 (C _p) 129,78 (C _m) 134,39 (C _i)	26,45 (C ₁₁) 47,95 (l, C ₁₀)	117,20 (C _{m''}) 118,67 (C _{m'}) 119,14 (C _{i'}) 128,97 (C _{o'}) 132,09 (C _{p'}) 159,33 (C _{o''})

45n^{a)}		157,65	151,42	118,69	152,88	139,37	123,43 (C _o) 127,63 (C _p) 129,56 (C _m) 135,05 (C _i)	26,48 (C ₁₁) 47,49 (C ₁₀)	114,55 (C _{o''}) 116,94 (C _{p'}) 118,66 (C _{o'}) 129,24 (C _{m'}) 139,51 (C _{i'}) 157,32 (C _{m''})
45o^{a)}		157,91	151,54	118,17	152,89	138,85	123,27 (C _o) 127,49 (C _p) 129,55 (C _m) 135,16 (C _i)	26,48 (C ₁₁) 47,48 (C ₁₀)	115,06 (C _{m'}) 129,10 (C _{i'}) 129,42 (C _{o'}) 159,33 (C _{p'})
45p^{b)}		158,13	151,66	118,19	152,92	138,90	123,43 (C _o) 127,62 (C _p) 129,63 (C _m) 135,21 (C _i)	26,53 (C ₁₁) 47,54 (C ₁₀)	115,35 (C _{o''} + C _{m'}) [*] 119,84 (C _{o'}) 129,66 (C _{i'}) 144,90 (C _{m''}) 147,60 (C _{p'})

45q^{a)}			158,97	149,02	117,65	152,38	139,19	124,00 (C_o) 128,23 (C_p) 129,84 (C_m) 134,52 (C_i)	26,49 (C_{11}) 47,68 (C_{10})	107,12 ($C_{m'}$) 111,56 ($C_{i'}$) 119,45 ($C_{o'}$) 132,70 ($C_{m''}$) 148,60 ($C_{p'}$) 149,35 ($C_{o''}$)
45rA^{b)}			158,19	151,63	118,10	152,78	138,89	123,48 (C_o) 127,56 (C_p) 129,53 (C_m) 135,17 (C_i)	26,46 (C_{11}) 47,43 (C_{10})	107,25 ($C_{o'}$) 128,45 ($C_{i'}$) 135,54 ($C_{p'}$) 145,51 ($C_{m'}$)
45rB^{b)}			158,25	151,63	118,29	152,74	139,09	123,48 (C_o) 127,62 (C_p) 129,57 (C_m) 135,12 (C_i)	44,54 (C_{11}) 47,43 (C_{10})	107,25 ($C_{o'}$) 128,34 ($C_{i'}$) 135,61 ($C_{p'}$) 145,54 ($C_{m'}$)
62a^{a)}	CH_2 12	H	152,49	150,22	119,39	153,31	138,46	123,44 (C_o) 127,59 (C_p) 129,43 (C_m) 134,93 (C_i)	24,26 (C_{12}) 25,70 (C_{11}) 45,71 (C_{10})	—————

62b^{a)}	O		152,42	150,34	119,58	153,43	139,05	123,47 (C _o) 127,71 (C _p) 129,46 (C _m) 134,82 (C _i)	45,36 (C ₁₀) 66,20 (C ₁₁)	_____
62c^{a)}	S		152,50	150,42	119,62	153,17	139,12	123,58 (C _o) 127,78 (C _p) 129,52 (C _m) 134,83 (C _i)	26,45 (C ₁₁) 47,59 (I, C ₁₀)	_____

* Carbono coincidente comprovado por HMQC.

A:B – Dois componentes presentes na amostra, na proporção relativa de 7:3.

3.3. Referências bibliográficas

- 1 Legraverend, M. Recent advances in the synthesis of purine derivatives and their precursors. *Tetrahedron* **64**, 8585-8603 (2008).
- 2 Ibrahim, N. & Legraverend, M. Synthesis of 6,7,8-Trisubstituted Purines via a Copper-Catalyzed Amidation Reaction. *J Org Chem* **74**, 463-465 (2008).
- 3 Legraverend, M. & Grierson, D. S. The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg Med Chem* **14**, 3987-4006 (2006).
- 4 Wan, Z. *et al.* N-Phenyl-N-purin-6-yl ureas: The design and synthesis of p38 α MAP kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 1191-1194 (2003).
- 5 Vandromme, L. *et al.* Suzuki-type Pd(0) coupling reactions in the synthesis of 2-aryl purines as Cdk inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 3144-3146 (2006).
- 6 Ding, S., Gray, N. S., Ding, Q. & Schultz, P. G. Expanding the diversity of purine libraries. *Tetrahedron Lett* **42**, 8751-8755 (2001).
- 7 Strouse, J. J., Ješelnik, M. & Arterburn, J. B. Applications of Boronic Acids in Selective C-C and C-N Arylation of Purines. *Acta Chim Slov* **52**, 187-199 (2005).
- 8 Agrofoglio, L. A., Gillaizeau, I. & Saito, Y. Palladium-Assisted Routes to Nucleosides. *Chem Rev* **103**, 1875-1916 (2003).
- 9 Wan, Z. K., Binnun, E., Wilson, D. P. & Lee, J. A Highly Facile and Efficient One-Step Synthesis of N6-Adenosine and N6-2'-Deoxyadenosine Derivatives. *Org Lett* **7**, 5877-5880 (2005).
- 10 Huang, L. K. *et al.* An efficient synthesis of substituted cytosines and purines under focused microwave irradiation. *Tetrahedron* **63**, 5323-5327 (2007).
- 11 Bakkestuen, A. K. & Gundersen, L. L. Regioselective N-9 arylation of purines employing arylboronic acids in the presence of Cu(II). *Tetrahedron Lett* **44**, 3359-3362 (2003).
- 12 Alves, M. J., Booth, B. L., Freitas, A. P. & Proenca, M. F. (Z)-N3-(2-amino-1,2-dicyanovinyl)formamidrazone: a precursor in the synthesis of 1,5-

diaminoimidazoles and 6-carbamoyl-1,2-dihydropurines. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 913-917 (1992).

13 Booth, B. L., Dias, A. M. & Proenca, M. F. Synthesis of 9-hydroxyalkyl-substituted purines from the corresponding 4-(C-cyanoformimidoyl)imidazole-5-amines. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 2119-2126 (1992).

14 Alves, M. J., Proença, M. F. & Booth, B. L. Synthesis of 4- and 5-disubstituted 1-benzylimidazoles, important precursors of purine analogs. *J Heterocycl Chem* **31**, 345-350 (1994).

15 Alves, M. J., Carvalho, M. A., Proença, M. F., Booth, B. L. & Pritchard, R. G. Synthesis of 6-cyanopurines and the isolation and X-ray structure of novel 2H-pyrroles. *J Heterocycl Chem* **34**, 739-743 (1997).

16 Booth, B. L. *et al.* A new and efficient approach to the synthesis of 6-amidino-2-oxopurines. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 1241-1251 (2001).

17 Al-Azmi, A. *et al.* Facile synthesis of 6-cyano-9-substituted-9H-purines and their ring expansion to 8-(arylamino)-4-imino-3-methylpyrimidino[5,4-d]pyrimidines. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 2532-2537 (2001).

18 Carvalho, M. A., Esteves, T. M., Proenca, M. F. & Booth, B. L. Efficient conversion of 6-cyanopurines into 6-alkoxyformimidoylpurines. *Org Biomol Chem* **2**, 1019-1024 (2004).

19 Carvalho, M. A., Zaki, M. E., Alvares, Y., Proenca, M. F. & Booth, B. L. Synthesis of novel 6-enaminopurines. *Org Biomol Chem* **2**, 2340-2345 (2004).

20 Alves, M. J. *et al.* A New Approach to the Synthesis of N,N-Dialkyladenine Derivatives. *European J Org Chem* **2007**, 4881-4887 (2007).

21 Correia, C., Carvalho, M. A. & Proença, M. F. Synthesis and *in vitro* activity of 6-amino-2,9-diaryl purines for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tetrahedron* **65**, 6903-6911 (2009).

22 Correia, C., Carvalho, M. A., Rocha, A. & Proença, M. F. General Synthetic Approach to 2-Phenolic Adenine Derivatives. *Synlett* **23**, 1923-1926 (2012).

23 Woodward, D. W., U. S. Pat., 2 534 331. (1950).

- 24 Cooks, R. G., Lambert, J. B., Lightner, D. A. & Shuwell, H. F. *Organic Structural Spectroscopy*. 1st edn, (Pentice Hall, USA, 1998).
- 25 Pereira, C. C. *Síntese e avaliação da actividade antioxidante e micobacteriana de novos derivados de imidazole e purina*, Universidade do Minho, (2010).

Capítulo 4

Atividade antifúngica de 6-amino-9-aryl purinas

4. Atividade antifúngica de 6-amino-9-irilpurinas

Nos últimos anos, o interesse pelo desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento de doenças infecciosas tem aumentado devido principalmente ao aparecimento de estirpes resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis.^{1,2}

Saccharomyces cerevisiae tem-se revelado um modelo bastante útil para elucidar mecanismos de ação e identificar os alvos de moléculas biologicamente ativas.³ É um organismo eucarionte unicelular e, geralmente apresenta uma forma elipsoide.⁴ Em 2006, o seu genoma foi totalmente sequenciado, sendo que é composto por cerca de 6000 genes.⁵ *S. cerevisiae* foi o primeiro eucarionte a ter o genoma totalmente sequenciado⁶ e, é um modelo celular muito utilizado em diversos estudos, uma vez que o seu crescimento é facilmente manipulável e, pode ser modificado geneticamente por técnicas bem estabelecidas.³ Além disso, a sua utilização para identificar novas moléculas com potencial atividade antifúngica é vantajosa, uma vez que esta levedura está estreitamente relacionada com fungos patogénicos humanos, nomeadamente *Candida albicans*.⁷

As infeções provocadas por *Candida* são um sério problema de saúde, em particular em doentes imunocomprometidos.⁸ *Candida albicans* é um dos principais fungos patogénicos para o Homem embora esteja presente, normalmente, no trato gastrointestinal e geniturinário.^{8,9} No entanto, quando ocorre um desequilíbrio no sistema imunitário, este fungo pode causar infeções à superfície ou pode ocorrer disseminação para quase todos os órgãos através da corrente sanguínea.^{8,9} Desta forma, é crucial o desenvolvimento de novos antifúngicos eficazes para o tratamento de infeções provocadas por *Candida albicans*.

A atividade antifúngica dos compostos **45a-p** e **62a-c** foi determinada de acordo com o procedimento descrito pelo CLSI,¹⁰ utilizando como modelos celulares *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 e *Candida albicans* SC 5314.

4.1. *Saccharomyces cerevisiae*

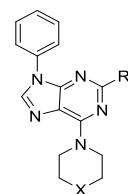
A atividade antifúngica dos compostos novos **45d-f**, **45m-p** e **62a-c** bem como, dos compostos anteriormente sintetizados no grupo de investigação **45a-c** e **45g-l** foi avaliada em *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072. Todos os compostos foram testados a concentrações que variaram entre 400 e 6,25 μM , com 1% de DMSO. Importa referir que os compostos **45a-p**, **62b** e **62c** não são solúveis no meio de cultura, às concentrações mais altas e, foram testados em suspensão.

Como controlo avaliou-se o efeito do DMSO no crescimento das células. Verificou-se que a concentração de DMSO utilizada na preparação das soluções dos compostos não influencia o crescimento de *S. cerevisiae*, quando comparado com o crescimento na ausência do solvente.

O valor da concentração mínima inibitória (MIC) foi definido como sendo a concentração mais baixa de composto que induz uma inibição do crescimento celular, num mínimo de 80%. Os valores de MIC para os compostos **45** e **62** encontram-se na tabela 4.1. Os resultados mostram que compostos **45a-d**, **45g-k**, **45m-p**, **62b** e **62c** não afetam o crescimento celular de *S. cerevisiae*, até a concentração máxima testada (400 μM), o que foi confirmado através do método das diluições seriadas. Com base nestes resultados, é possível concluir que os compostos **45a-d**, **45g-k**, **45m-p**, **62b** e **62c** não possuem atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*.

Por outro lado, os compostos **45e**, **45f**, **45l** e **62a** são ativos contra *S. cerevisiae*. Os valores de MIC são 400 μM para o composto **62a**, 100 μM para o **45e** e 25 μM para os **45f** e **45l** (Tabela 4.1). Os valores de MIC foram confirmados através do método das diluições seriadas, que permitiu também determinar que todos os compostos são fungistáticos, uma vez que inibem o crescimento celular de *S. cerevisiae* (Figura 4.1).

Tabela 4.1. Valores de MIC (μM) para as 6-amino-9-arylporinas 45 e 62 em *Saccharomyces cerevisiae* PYCC4072.



$\text{R}^1 \backslash \text{X}$		CH_2		O		S
	45a	>400	45g	>400	45m	>400
	45b	>400	45h	>400	45n	>400
	45c	>400	45i	>400	45o	>400
	45d	>400	45j	>400	45p	>400
	45e	100 ¹	45k	>400	45q	n.d.
	45f	25 ¹	45l	25 ¹	45r	n.d.
H	62a	400 ¹	62b	>400	62c	>400
Fluconazole	17	12,5 ¹				
Flucitosina	23	0,39 ²				

¹Fungistático

²Fungicida

n.d. – não determinado

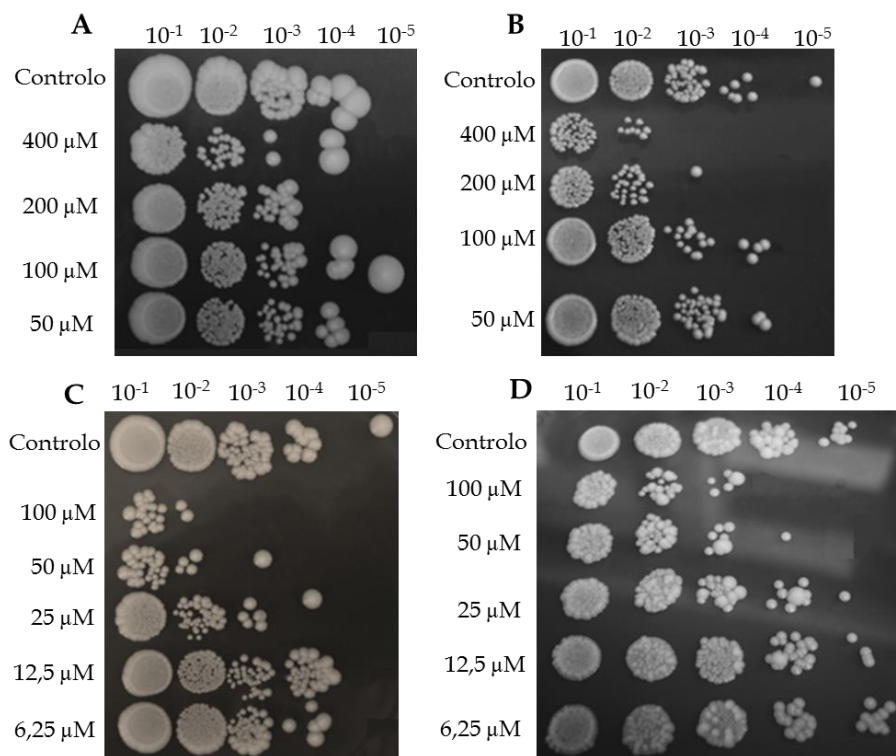


Figura 4.1. Atividade antifúngica dos compostos **62a** (A), **45e** (B), **45f** (C) e **45l** (D) contra *S. cerevisiae*, a diferentes concentrações. Após 48h de incubação com as diferentes concentrações dos compostos, as suspensões celulares foram diluídas e inoculadas em YEPDA. Após 48h, a 30 °C, as placas foram fotografadas com o ChemiDoc XRS.

O composto **45e** não era solúvel no meio de cultura às concentrações mais elevadas (400 e 200 µM) e, nas concentrações entre 100 e 25 µM induzia a dispersão das células. Desta forma, não foi possível determinar o valor de MIC, com base na densidade ótica (DO). Apesar da atividade do composto **45e** ser evidenciada pelo método das diluições seriadas, este fornece apenas uma análise qualitativa, não permitindo determinar o valor do MIC. Assim, para calcular o MIC do composto **45e** determinou-se a percentagem de células viáveis, através da contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFCs), após 48 horas de incubação com as diferentes concentrações do composto. Como se pode observar na figura 4.2, todas as concentrações testadas diminuem a percentagem de células viáveis de *S. cerevisiae*. À concentração de 100 µM verifica-se uma diminuição da viabilidade celular superior a 80%, permitindo desta forma concluir que o MIC do composto **45e** é 100 µM.

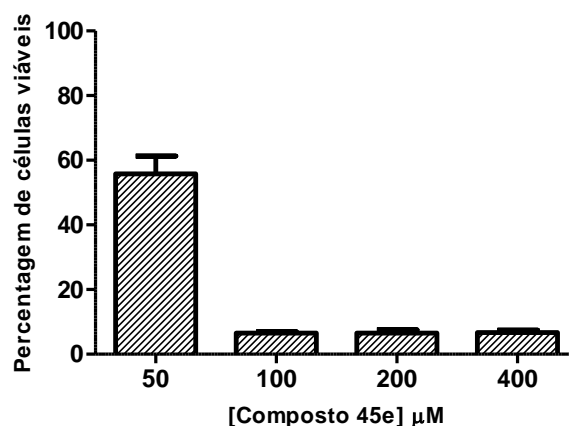


Figura 4.2. Viabilidade celular de *S. cerevisiae* após 48h de incubação com diferentes concentrações (50 – 400 μM) do composto 45e. A viabilidade celular foi avaliada através da contagem de UFCs. Os UFCs resultantes da incubação com as diferentes concentrações de composto foram comparados com os UFCs obtidos a partir da incubação de *S. cerevisiae* com 1% de DMSO (100% de viabilidade). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão ($n=7$) e, são representativos de 3 experiências independentes.

Como referência foram utilizados os antifúngicos fluconazole **17** e flucitosina **23** que apresentaram MICs de 12,5 e 0,39 μM , respetivamente (Tabela 4.1). Com base no método das diluições seriadas, foi possível classificar o fluconazole **17** como fungistático (Figura 4.3A) e a flucitosina **23** como fungicida, visto que este composto provoca a morte das células de *S. cerevisiae* (Figura 4.3B).

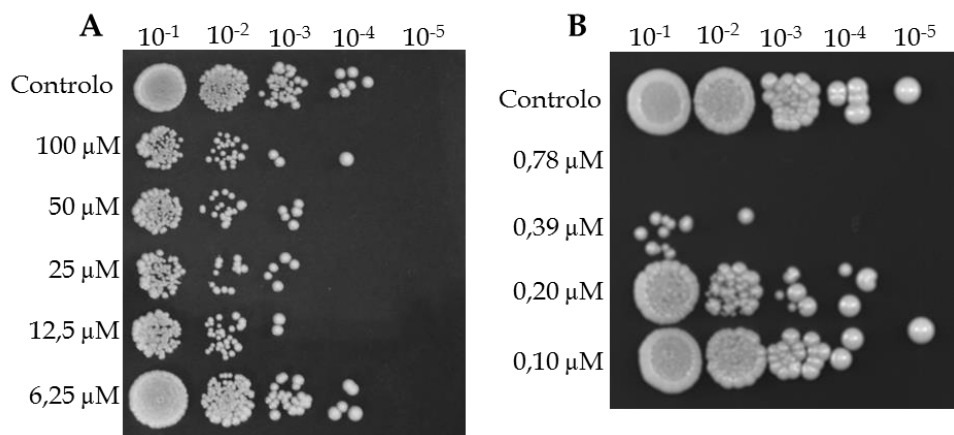


Figura 4.3. Atividade antifúngica do fluconazole 17 (A) e flucitosina 23 (B) contra *S. cerevisiae*, a diferentes concentrações. Após 48h de incubação com as diferentes concentrações dos compostos, as suspensões celulares foram diluídas e inoculadas em YEPDA. Após 48h, a 30 °C, as placas foram fotografadas com o ChemiDoc XRS.

Com base nos resultados, é possível concluir que a presença de três grupos hidroxilo na unidade fenólica em C2 é crucial para a atividade antifúngica, uma vez que os compostos contendo um e dois grupos hidroxilo não apresentam atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*. Além disso, os resultados obtidos para os compostos **45e** e **45k** ($R^1=2,3,4-(HO)_3C_6H_2$) e, para os compostos **45f** e **45l** ($R^1=3,4,5-(HO)_3C_6H_2$) mostram que o padrão de substituição influencia a atividade sendo que a presença dos grupos hidroxilo nas posições 3, 4 e 5 origina valores de MIC mais baixos. Este padrão de substituição é igualmente encontrado em antifúngicos naturais, como o pirogallol **37** e o ácido gálico **38** e, foi também observado em alguns compostos sintéticos, descritos em Areias.¹¹

Os derivados de purina **45f** e **45l** apresentam o mesmo valor de MIC (25 µM) sugerindo que, quando $R^1=3,4,5-(HO)_3C_6H_2$, o substituinte presente em C6 não influencia atividade.

Por outro lado, comparando os resultados obtidos para os compostos **62a-c** ($R^1=H$), é possível concluir que a unidade de piperidinil em C6 é importante para a atividade, já que quando esta é substituída pela unidade de morfolino ou tiomorfolino, os compostos perdem a atividade antifúngica. Este

facto é comprovado pelos valores de MIC obtidos para os compostos **45e** e **45k**, com $R^1=2,3,4-(HO)_3C_6H_2$.

Os compostos **45e**, **45f** e **62a** diferem apenas no substituinte da posição 2 do anel de purina. Comparando os valores de MIC destes compostos (Tabela 4.1), podemos concluir que o substituinte presente em C2 influencia atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*, sendo que a presença de unidades fenólicas na posição 2 do anel de purina favorece a atividade.

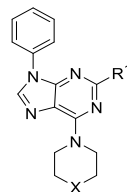
4.2. *Candida albicans*

A atividade antifúngica dos compostos **45g-1** e **62b** foi também avaliada, utilizando como modelo celular *Candida albicans* SC 5314. A gama de concentrações testada foi a mesma dos ensaios com *S. cerevisiae*. O efeito da concentração de DMSO no crescimento das células de *Candida albicans* foi também avaliado e, concluiu-se que este não induz diferenças significativas no crescimento de *C. albicans*, quando comparado com o controlo sem DMSO.

Os compostos **45g-1** e **62b** não inibem o crescimento celular de *C. albicans*, num mínimo de 80%, a todas as concentrações testadas (Tabela 4.3). Estes resultados são confirmados pelo método das diluições seriadas, onde é possível constatar que os compostos não influenciam o crescimento da levedura. Desta forma, pode concluir-se que os compostos **45g-1** e **62b** não possuem atividade antifúngica contra *C. albicans*.

Os resultados permitem concluir que, para os derivados de purina com a unidade de morfolino em C6, o número de grupos hidroxilo bem como o padrão de substituição não influencia a atividade, uma vez que os compostos **45g-1** não apresentam atividade antifúngica contra *C. albicans*. Além disso, os resultados obtidos para os compostos com unidades fenólicas ou protão em C2 sugerem que o substituinte presente na posição 2 do anel de purina não afeta a atividade.

Tabela 4.2. Valores de MIC (μM) para as 6-amino-9-arylpurinas 45g-l e 62b em *Candida albicans* SC 5314.



R¹ \ X		O
45g		>400
45h		>400
45i		>400
45j		>400
45k		>400
45l		>400
62b	H	>400
17	Fluconazole	$\leq 12,5^1$
23	Flucitosina	$\leq 12,5^2$

¹Fungistático

²Fungicida

Os antifúngicos fluconazole **17** e flucitosina **23** foram utilizados como referência. A concentração mais baixa testada para ambos foi 12,5 μ M e, constata-se que, a esta concentração, quer o fluconazole **17** quer flucitosina **23**, são capazes de inibir em mais de 80% o crescimento celular de *C. albicans* (Tabela 4.3). Recorrendo ao método das diluições seriadas, foi possível ainda classificar o fluconazole **17** como fungistático (Figura 4.4A) e a flucitosina **23** como fungicida (Figura 4.4B).

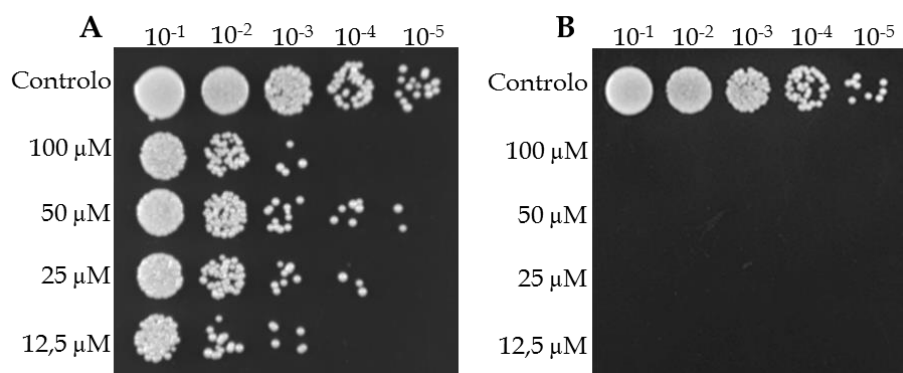


Figura 4.4. Atividade antifúngica do fluconazole **17** (A) e flucitosina **23** (B) contra *C. albicans*, a diferentes concentrações. Após 48h de incubação com as diferentes concentrações dos compostos, as suspensões celulares foram diluídas e inoculadas em YEPDA. Após 48h, a 30 °C, as placas foram fotografadas com o ChemiDoc XRS.

4.3. Referências bibliográficas

- 1 Yoneyama, H. & Katsumata, R. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 1060-1075 (2006).
- 2 Kanafani, Z. A. & Perfect, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin Infect Dis* **46**, 120-128 (2008).
- 3 Ma, D. Applications of yeast in drug discovery. *Prog Drug Res* **57**, 117-162 (2001).
- 4 Schaechter, M. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2nd edn, (Academic Press Inc., USA, 2009).
- 5 Goffeau, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546-567 (1996).
- 6 Enserink, J. M. Chemical genetics: budding yeast as a platform for drug discovery and mapping of genetic pathways. *Molecules* **17**, 9258-9273 (2012).
- 7 Hughes, T. R. Yeast and drug discovery. *Funct Integr Genomics* **2**, 199-211 (2002).
- 8 Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. & Kozik, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* **56**, 211-224 (2009).
- 9 Spampinato, C. & Leonardi, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int* **2013**, 204237 (2013).
- 10 CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*. 3rd edn, CLSI document M27-A3 (CLSI, USA, 2008).
- 11 Areias, F. *Novos compostos heterocíclicos de azoto com unidades fenólicas: síntese e actividade biológica*, Universidade do Minho, (2006).

Capítulo 5

Rastreio fármaco-genómico com o composto **45f**

5. Rastreo fármaco-genómico com o composto **45f**

As infeções fúngicas têm vindo a aumentar nos últimos anos, tornando-se uma ameaça para a saúde mundial.^{1,2} O número limitado de agentes antifúngicos disponíveis atualmente para o tratamento destas infeções bem como a resistência a estes fármacos levou a um aumento na procura de novas moléculas ativas.³

Os ensaios de inibição de crescimento são bastante úteis na identificação de compostos com potencial atividade antifúngica mas não permitem a identificação do respetivo alvo.^{4,5} O conhecimento dos alvos e dos processos celulares afetados por um composto é extremamente útil, uma vez que permite o desenho racional de novas moléculas.⁶

Apesar da descoberta do mecanismo de ação de um composto não ser fácil, a utilização de abordagens fármaco-genéticas tem-se revelado muito promissora na identificação de alvos e mecanismos de ação de moléculas ativas.⁷ Através da análise sistemática dos genes de um genoma, um rastreo fármaco-genómico visa identificar relações funcionais entre genes específicos e compostos químicos. Assim, a abordagem mais comum é alterar um gene e observar o fenótipo resultante na presença da molécula ativa.⁸ A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um modelo eucarionte muito utilizado nesta abordagem uma vez que possui várias coleções de mutantes disponíveis.⁶

Com o objetivo de identificar os genes envolvidos na sensibilidade e na resistência ao composto **45f** utilizou-se uma coleção de mutantes haploides de *S. cerevisiae* da Euroscarf. Esta coleção inclui aproximadamente 5100 estirpes, sendo que cada uma apresenta uma deleção num gene não essencial de *S. cerevisiae*.⁹

5.1. Otimização das condições experimentais

Os resultados apresentados no capítulo 4 mostraram que o composto **45f** tem atividade antifúngica contra *S. cerevisiae* PYCC 4072, com um valor de MIC de 25 μ M. No entanto, a coleção de mutantes da Euroscarf disponível para a realização do rastreio foi construída a partir da estirpe *S. cerevisiae* BY4741. Assim, foi necessário determinar a atividade antifúngica do composto **45f** em *S. cerevisiae* BY4741, utilizando as mesmas condições experimentais e, os resultados mostraram que o composto **45f** apresenta o mesmo valor de MIC (25 μ M), em *S. cerevisiae* BY4741.

Posteriormente, foi necessário estabelecer as condições experimentais para a identificação em larga escala dos mutantes sensíveis e resistentes ao composto **45f** em comparação com a estirpe parental (*S. cerevisiae* BY4741), tendo-se usado placas de 96 poços e testado vários fatores, como a concentração do composto **45f**, a realização de um pré-inóculo e, a diluição do inóculo para a placa de tratamento.

Realizaram-se ensaios com algumas estirpes da coleção utilizando duas concentrações do composto **45f**, nomeadamente 25 e 50 μ M tendo-se optado pela concentração de 50 μ M, já que esta permitia uma distinção mais precisa das estirpes sensíveis e resistentes. Por outro lado, optou-se pela realização de um pré-inóculo que permitiu a obtenção das culturas de *S. cerevisiae* sensivelmente à mesma DO, eliminando desta forma a possível influência da fase de crescimento e da relação número de células/quantidade de composto na resposta ao derivado **45f**. Por último, utilizando a estirpe parental, verificou-se que a diluição do inóculo utilizando o replicador de 96 pinos, resultava numa grande variabilidade nas DOs. Desta forma, optou-se por realizar a diluição do inóculo utilizando uma pipeta multicanal.

5.2. Identificação de estirpes mutantes sensíveis e resistentes em resposta ao composto **45f**

A partir da coleção de mutantes haploides de *S. cerevisiae* BY4741 da Euroscarf, foram testadas aproximadamente 3600 estirpes na presença do composto **45f**, das quais 223 apresentaram um fenótipo mais resistente que a estirpe parental e 95 um fenótipo mais sensível. Os genes envolvidos nos fenótipos de resistência e sensibilidade foram identificados e agrupados em diversas categorias funcionais de acordo com a base de dados *MIPS Functional Catalogue*. As diferentes categorias funcionais identificadas, quer para as estirpes sensíveis quer para as resistentes, encontram-se representadas na figura 5.1.

“Enrolamento e a modificação de proteínas” é a categoria funcional mais representada tanto nas estirpes resistentes (~13%) como nas sensíveis (~9%). Entre os genes identificados encontram-se *UBR1*, *VPS36*, *HLJ1*, *VAM6* e *VPS29*, também identificados num rastreo fármaco-genómico com higromicina B.¹⁰ A higromicina B é um antibiótico natural, da classe dos aminoglicosídeos, produzido pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. É um inibidor da síntese proteica bloqueando a translocação ribossomal e apresenta atividade antibacteriana e antifúngica.¹¹ Estes resultados sugerem que o composto **45f** poderá atuar ao nível da síntese proteica originando um aumento da desnaturação de proteínas. De facto, a síntese proteica (~7%) revelou ser particularmente importante para a tolerância ao composto **45f**. A cicloheximida é um inibidor da síntese proteica e, atua igualmente na etapa de translocação ribossomal.¹² Um rastreo fármaco-genómico para a cicloheximida¹⁴ evidenciou genes em comum com o rastreo do composto **45f**, reforçando a conclusão de que este composto poderá interferir na síntese proteica.

Estirpes deficientes em genes que codificam transportadores e proteínas envolvidas no ciclo celular encontram-se também afetadas, mostrando sensibilidade e resistência ao composto **45f**.

A rapamicina é um agente anticancerígeno que atua pela ligação à proteína FKBP12, formando um complexo que posteriormente se vai ligar à

proteína mTOR, inibindo-a, provocando assim a paragem do ciclo celular.¹³ Hillenmeyer *et al*¹⁰ demonstraram, através de um rastreio fármaco-genómico com a rapamicina, que o ciclo celular estava afetado na presença deste composto. Entre os genes identificados verifica-se que existem genes em comum com os identificados na sensibilidade e resistência ao composto **45f** (por exemplo *CDH1*, *ARD1*, *DCR2*, *BIT61*, *SIC1*). Assim, os resultados sugerem que o composto **45f** poderá induzir alterações na atividade do complexo TOR2C e na progressão do ciclo celular. O facto de um grande número de genes com função no ciclo celular apresentar fenótipo alterado na presença do composto está de acordo com o observado nos ensaios da secção anterior onde se verificou que este atua essencialmente como inibidor do crescimento da levedura. A transição G1/S para entrada em mitose parece estar particularmente afetada, uma vez que estirpes deficientes em genes que controlam esta fase do ciclo celular apresentam resistência aumentada na presença do composto.

Um número considerável de genes envolvidos no metabolismo de nucleótidos, nucleósidos ou bases púricas estão presentes nos mutantes com fenótipo alterado. Em particular, a biossíntese de purinas surge especialmente representada mostrando uma interferência do composto **45f** com o metabolismo de moléculas que incorporam estas bases. Se atendermos às possíveis semelhanças estruturais, os resultados sugerem que o composto poderá estar a atuar como substrato/inibidor de uma ou várias etapas desta via metabólica.

Tal como foi referido anteriormente (Capítulo 1), existem compostos polifenólicos, entre os quais a quercetina, que afetam vias de transdução de sinal. Como se pode ver na figura 5.1, “transdução de sinal” é umas das categorias funcionais mais representadas (7%) nas estirpes sensíveis ao composto **45f**. Visto que o derivado de purina utilizado no rastreio possui uma unidade fenólica em C2, esta unidade poderá estar a afetar os processos de transdução de sinal.

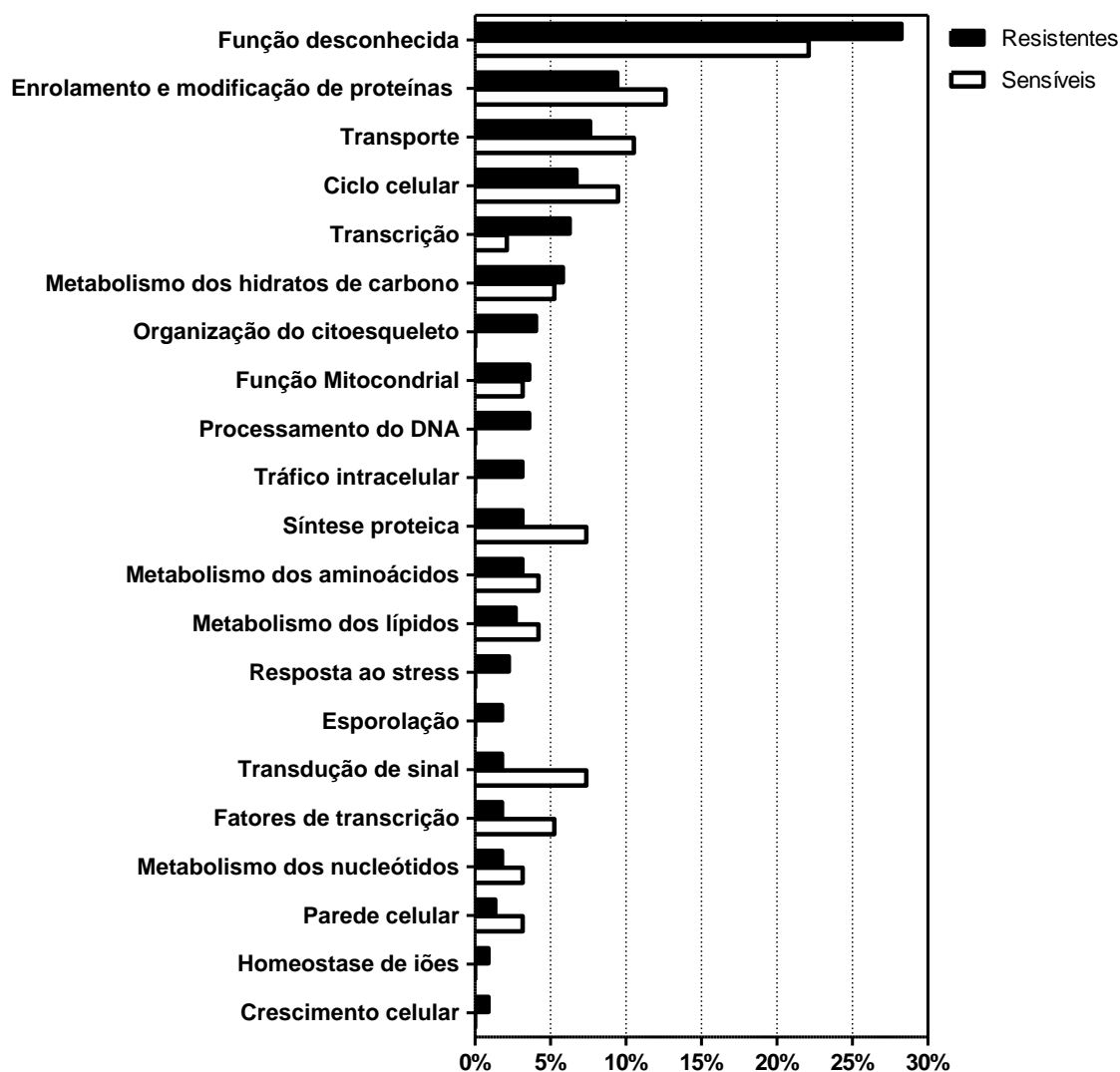


Figura 5.1. Categorias funcionais identificadas envolvidas na sensibilidade e resistência ao composto 45f. Os genes encontrados no rastreo fármaco-genómico foram agrupados de acordo com a base de dados *MIPS Functional Catalogue*. As percentagens de cada categoria funcional foram calculadas através da razão entre o número de genes identificados em cada categoria e o número total de genes testado.

5.3. Identificação das categorias funcionais enriquecidas significativamente na resposta ao composto 45f

A análise acima descrita permitiu identificar as principais funções afetadas em resposta ao composto 45f. Porém, as categorias descritas basearam-se no total de estirpes testadas, podendo estes resultados não se refletirem quando se tem em conta o genoma completo de *S. cerevisiae*. Para identificar as categorias funcionais enriquecidas relativamente ao genoma completo, ou seja, as categorias que têm uma representação estatisticamente mais significativa foi realizada uma análise utilizando o FUNSPEC (<http://funspec.med.utoronto.ca/>). Assim, a frequência das categorias funcionais identificadas no conjunto de estirpes sensíveis e resistentes ao composto 45f foram comparadas com a frequência das mesmas categorias no genoma completo de *S. cerevisiae*. As tabelas 5.1 e 5.2 mostram as categorias funcionais significativamente enriquecidas (valor de *p* inferior a 0,01).

Como se pode verificar pela tabela 5.1, a acidificação do vacúolo e o transporte vacuolar/lisossomal são processos importantes para a resistência ao composto 45f. Além disso, é possível verificar que o vacúolo e a sua membrana encontram-se afetados na presença do composto 45f. Concretamente, ao nível da membrana do vacúolo, as estirpes deficientes nos genes *VMA9*, *VMA5* e *VPH1*, que codificam componentes da ATPase vacuolar (V-ATPase) apresentam um fenótipo de sensibilidade, indicando que esta proteína poderá ser direta ou indiretamente afetada pelo composto. Desta forma, com base nestes resultados, é possível constatar que um vacúolo funcional é importante na defesa da célula contra o derivado de purina 45f. Morton *et al*¹⁴ descreveram igualmente o vacúolo como um importante mecanismo de defesa de *S. cerevisiae* a dermaseptina S3(1-16), um péptido que apresenta atividade lítica de membranas e que tem vários alvos intracelulares.

Na lista de funções enriquecidas nos mutantes sensíveis, encontra-se os genes *PKH1* e *PKH3* que codificam cinases de proteínas ativadas por lípidos (estando a proteína Pkh1 envolvida especificamente na sinalização por

esfingolípido) e que regulam a endocitose e a MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) da via da integridade da parede, a Pkc1. De acordo com estes resultados, a deleção de genes envolvidos na síntese (*LAC1*) e regulação (*LCB3*) da ceramida, um esfingolípido com funções reguladoras importantes, origina uma maior resistência ao composto. Várias cinases têm sido descritas como alvos de derivados de purina,¹⁵ o que está também de acordo com os nossos resultados. Nos casos descritos, estudos de raios X permitiram verificar que os derivados de purina **65** e **66**, podem ligar-se diretamente ao centro ativo das cinases p38 α e Cdk2, inibindo a sua atividade.¹⁵

Entre as funções associadas à sensibilidade estão ainda o metabolismo da glucose (genes *NRG1*, *FBP26* e *RGT1*) e da arginina (genes *ARG5,6* e *ARG4*). No primeiro caso os dados sugerem que a desrepressão pela glucose pode ser importante para a robustez da resposta ao composto. A indução de inúmeros genes da resposta ao *stress* que se encontram normalmente reprimidos pela glucose, poderá estar na base deste fenótipo. No segundo caso, os resultados sugerem que o composto **45f** poderá afetar a disponibilidade intracelular da arginina ou de um aminoácido derivado a partir desta, atuando diretamente na sua síntese ou no seu transporte do meio extracelular. De facto, apoiando esta hipótese verificou-se que a deleção do gene *GNP1*, que codifica uma permease de alta afinidade para a glutamina e mais 6 aminoácidos, origina igualmente um fenótipo de sensibilidade ao composto.

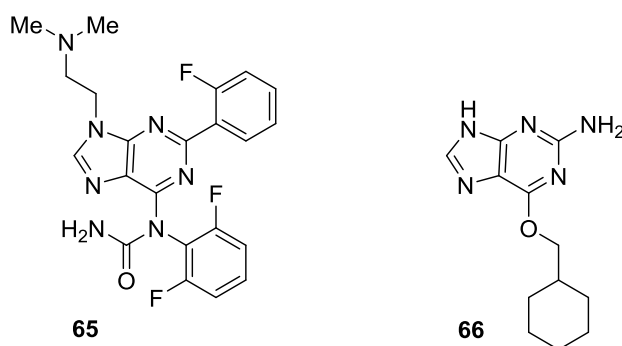


Figura 5.2. Estruturas dos derivados de purina **65** e **66**.

Tabela 5.1. Categorias funcionais significativamente enriquecidas (valor de p inferior a 0,01) que se baseiam na identificação dos genes cuja deleção provoca um aumento da sensibilidade ao composto 45f.

Categoria	p	N.º de genes identificados	N.º de genes na categoria
Processo Biológico			
Transporte de eletrões acoplado à hidrólise de ATP [GO:0015991]	1,70E-03	3	17
Cascata MAPKKK envolvida na biossíntese da parede celular [GO:0000196]	2,96E-03	2	6
Metabolismo da glucose [GO:0006006]	4,15E-03	3	23
Acidificação do vacúolo [GO:0007035]	5,90E-03	3	26
Transporte vacuolar/lisossomal [MIPS:20.09.13]	6,29E-03	7	153
Biossíntese da arginina [GO:0006526]	8,55E-03	2	10
Componente Celular			
Membrana do vacúolo típicas dos fungos [GO:0000329]	1,47E-03	7	118
Hrd1p, ubiquitina ligase do complexo ERAD-L [GO:0000839]	2,96E-03	2	6
Membrana do vacúolo [GO:0005774]	3,04E-03	7	134
Transportador de protões vacuolar do tipo V-ATPase, domínio V0 [GO:0000220]	4,10E-03	2	7
Vacúolo [GO:0005773]	8,52E-03	7	162

Pela tabela 5.2, é possível constatar que o *budding*, a polaridade celular e a formação de filamentos são processos biológicos afetados pelo composto **45f**, contribuindo para a sensibilidade a este. Adicionalmente, nas estirpes resistentes, outra classe enriquecida significativamente é “ligação a proteínas de choque térmico”. Estas proteínas estão envolvidas em vários processos entre os quais o enrolamento de proteínas,¹⁶ categoria funcional mais representada nas estirpes sensíveis e resistentes identificadas na presença do composto **45f** (Figura 5.1). Recentemente, Llauger *et al*¹⁷ descreveram derivados de purina que atuam como inibidores da proteína HSP90. Desta forma, o derivado de purina **45f** também pode atuar como inibidor desta classe de proteínas.

Dois genes que codificam proteínas envolvidas no catabolismo do etanol aparecem também no grupo dos mutantes resistentes sugerindo que o bloqueio do consumo de etanol em fase diáuxica poderá ser benéfico para a resistência ao composto. De acordo com estes resultados a deficiência da enzima gluconeogénica frutose 1,6-bisfosfato 1-fosfatase origina também uma maior resistência.

O transporte Golgi-endossoma está também envolvido na resposta ao composto **45f**, estando a deficiência nos genes *PEP8*, *DID4* e *VPS36* associada a uma maior resistência. Os genes *DID4* e *VPS36* codificam componentes dos complexos ESCRT-III e ESCRT-II, respetivamente, envolvidos na endocitose e no transporte de proteínas para o vacúolo (ESCRT-III) e para o endossoma (ESCRT-II). A deficiência no gene *PEP8*, que codifica igualmente uma proteína envolvida no transporte de proteínas para o vacúolo, está associada a uma maior sensibilidade a inúmeras drogas,¹⁰ as confere resistência ao níquel,¹⁸ à edelfusina (um fosfolípido com atividade anticancerígena),¹⁹ ao fenpropimorfe (inibidor da síntese de ergosterol) e à tunicamicina (inibidor da glicosilação de proteínas).²⁰ Por analogia com alguns dos mecanismos propostos para estes compostos os resultados sugerem que o composto **45f** poderá estar a induzir o transporte inadequado de lípidos ou proteínas no sistema endomembranar, nomeadamente interferindo na endocitose.

Tabela 5.2. Categorias funcionais significativamente enriquecidas (valor de p inferior a 0,01) que se baseiam na identificação dos genes cuja deleção provoca um aumento da resistência ao composto 45f.

Categoria	p	N.º de genes identificados	N.º de genes na categoria
Processo Biológico			
Atividade da frutose 1,6-bisfosfato 1-fosfatase [GO:0042132]	1,08E-3	2	2
<i>Budding</i> , polaridade celular e formação de filamentos [MIPS:43.01.03.05]	1,40E-3	21	312
Retenção de proteínas no complexo de Golgi [GO:0045053]	4,81E-03	3	11
Metabolismo do etanol [GO:0006067]	6,23E-03	2	4
Ligação a proteínas de choque térmico [GO:0031072]	6,24E-3	4	23
Componente Celular			
Citoplasma [MIPS:725]	3,65E-6	128	2879

5.4. Referências bibliográficas

- 1 Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. & Kozik, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* **56**, 211-224 (2009).
- 2 Richardson, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **56 Suppl 1**, i5-i11 (2005).
- 3 Fostel, J. M. & Lartey, P. A. Emerging novel antifungal agents. *Drug Discov Today* **5**, 25-32 (2000).
- 4 Barbosa, M. D., Yang, G., Fang, J., Kurilla, M. G. & Pompliano, D. L. Development of a whole-cell assay for peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 943-946 (2002).
- 5 Hoepfner, D. *et al.* An integrated approach for identification and target validation of antifungal compounds active against Erg11p. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 4233-4240 (2012).
- 6 Kemmer, D. *et al.* Combining chemical genomics screens in yeast to reveal spectrum of effects of chemical inhibition of sphingolipid biosynthesis. *BMC Microbiol* **9**, 9 (2009).
- 7 Hoon, S., St.Onge, R. P., Giaever, G. & Nislow, C. Yeast chemical genomics and drug discovery: an update. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 499-504 (2008).
- 8 Andrusiak, K., Piotrowski, J. S. & Boone, C. Chemical-genomic profiling: Systematic analysis of the cellular targets of bioactive molecules. *Bioorg Med Chem* **20**, 1952-1960 (2012).
- 9 Sousa, M. *et al.* Genome-wide identification of genes involved in the positive and negative regulation of acetic acid-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics-under revision*.
- 10 Hillenmeyer, M. E. *et al.* The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science* **320**, 362-365 (2008).
- 11 Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Fredrick, K. & Cate, J. H. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA* **14**, 1590-1599 (2008).

- 12 Schneider-Poetsch, T. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* **6**, 209-217 (2010).
- 13 Madke, B. Topical rapamycin (sirolimus) for facial angiofibromas. *Indian Dermatol Online J* **4**, 54-57 (2013).
- 14 Morton, C. O. *et al.* Global phenotype screening and transcript analysis outlines the inhibitory mode(s) of action of two amphibian-derived, alpha-helical, cationic peptides on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3948-3959 (2007).
- 15 Legraverend, M. & Grierson, D. S. The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg Med Chem* **14**, 3987-4006 (2006).
- 16 Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S. & Wang, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2560-2570 (2006).
- 17 Llauger, L. *et al.* Evaluation of 8-Arylsulfanyl, 8-Arylsulfoxyl, and 8-Arylsulfonyl Adenine Derivatives as Inhibitors of the Heat Shock Protein 90. *J Med Chem* **48**, 2892-2905 (2005).
- 18 Ruotolo, R., Marchini, G. & Ottonello, S. Membrane transporters and protein traffic networks differentially affecting metal tolerance: a genomic phenotyping study in yeast. *Genome Biol* **9**, R67 (2008).
- 19 Cuesta-Marbán, Á. *et al.* Drug Uptake, Lipid Rafts, and Vesicle Trafficking Modulate Resistance to an Anticancer Lysophosphatidylcholine Analogue in Yeast. *J Biol Chem* **288**, 8405-8418 (2013).
- 20 Kapitzky, L. *et al.* Cross-species chemogenomic profiling reveals evolutionarily conserved drug mode of action. *Mol Syst Biol* **6**, 451 (2010).

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas futuras

6. Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho desenvolvido no âmbito desta tese de mestrado possibilitou a síntese de doze 6-amino-9-aryl-purinas, das quais nove contêm uma unidade fenólica em C2 e as restantes contêm um protão na mesma posição. Os novos derivados de purina foram caracterizados estruturalmente recorrendo a técnicas analíticas e espectroscópicas.

A abordagem sintética utilizada para a síntese das purinas fenólicas conduz a uma elevada degradação da mistura reacional e à formação de um subproduto - purina não fenólica. A obtenção dos compostos com um grau de pureza adequado foi conseguida através da otimização de um procedimento de purificação. Assim, os derivados fenólicos foram purificados por cromatografia em *flash* seca, o que contribuiu para os baixos rendimentos.

A atividade antifúngica dos novos compostos bem como de 6-amino-9-aryl-purinas anteriormente sintetizadas foi avaliada recorrendo a *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*.

Os compostos **45e**, **45f** e **45l**, com unidades fenólicas em C2 e, o composto **62a**, com protão em C2, exibem atividade antifúngica contra *S. cerevisiae*. Os valores de MIC são 100, 25, 25 e 400 µM, respetivamente. A relação estrutura-atividade permitiu concluir que os substituintes em C2 e C6 influenciam a atividade contra *S. cerevisiae*. A unidade fenólica na posição 2 do anel de purina potencia a atividade. Os estudos SAR permitiram concluir ainda que o número e o padrão de substituição dos grupos hidroxilo influencia largamente a atividade, sendo que os compostos com a unidade 3,4,5-(HO)₃C₆H₂ são os mais ativos. Os compostos **45f** e **45l** apresentam atividade antifúngica comparável com um composto de referência, o fluconazole (MIC = 12,5 µM), podendo ser utilizados como *leads* no desenvolvimento de novos antifúngicos.

Relativamente à atividade antifúngica contra *C. albicans*, os compostos **45g-l** e **62b** não exibem atividade às concentrações testadas.

O rastreio fármaco-genómico de uma coleção de mutantes de *S. cerevisiae* da Euroscarf utilizando o composto **45f** mostrou que “enrolamento e modificação de proteínas” é a categoria funcional mais representada nas

estirpes sensíveis e resistentes. O *budding*, a polaridade celular e a formação de filamentos contribuem para a resistência de *S. cerevisiae* ao composto **45f**. Adicionalmente, constatou-se que o vacúolo tem um papel importante na defesa da célula contra o derivado de purina testado. O metabolismo de purinas, de aminoácidos e a glicólise/gliconeogénese mostraram-se igualmente importantes na resposta ao composto. Assim, foram abertas inúmeras linhas de trabalho que importa agora desenvolver em detalhe para a definição de um mecanismo de ação do composto **45f** e, potencialmente dos compostos do mesmo tipo para os quais foi detetada atividade antimicrobiana.

Em trabalho futuro será ainda pertinente, para completar os estudos SAR determinar a atividade antifúngica dos compostos **45q** e **45r** contra *S. cerevisiae*. Por outro lado, é importante avaliar a atividade antifúngica dos restantes derivados de purina em *C. albicans*. Adicionalmente, é crucial completar o rastreio fármaco-genómico do composto **45f** para completar a identificação das principais vias afetadas na sua presença.

Capítulo 7

Materiais e métodos

7. Materiais e métodos

7.1. Instrumentação e reagentes

Os reagentes e os solventes utilizados para a síntese dos compostos foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Merck, Fisher, Riedel, Panreac, Lab-Scan e Acros. Os solventes usados nas reações tinham a designação de puros. Tanto os reagentes como os solventes foram utilizados sem qualquer processo prévio de purificação, com exceção da Et₃N que foi purificada recorrendo a destilação simples.

As reações foram seguidas por TLC usando placas de gel de sílica (Merck 60 F₂₅₄), sendo a revelação feita por luz ultravioleta e/ou iodo. A sílica utilizada nas purificações foi gel de sílica 230-400 (Merck).

As evaporações de solvente foram realizadas no evaporador rotativo Buchi R-210, sob pressão reduzida.

Os espectros de ¹H e ¹³C de RMN foram registados num espectrofotómetro Varian Unity Plus (¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz) ou Bruker Avance III (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz), à temperatura ambiente. Como solvente utilizou-se DMSO deuterado (DMSO-d₆) e, os deslocamentos químicos foram registados em ppm e as constantes de acoplamento em Hz. Nos espectros de ¹H e ¹³C RMN, o pico do DMSO-d₆ foi usado como referência interna e foi ajustado a δ 2,49 e 39,5 ppm, respetivamente. Foi utilizada água deuterada para promover o desaparecimento dos picos referentes a prótons ligados a átomos de nitrogénio e oxigénio. Foram ainda usadas as técnicas de HMQC e HMBC para identificar átomos de carbono diretamente ligados ou a três ligações de átomos de hidrogénio, respetivamente.

As análises elementares foram determinadas num aparelho LECO CHNS-932.

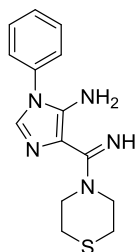
Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro Bomem MB 104. A preparação das amostras sólidas foi realizada usando Nujol, em células de cloreto de sódio.

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Stuart SMP3 e não foram corrigidos.

7.2. Procedimento experimental para a síntese dos compostos

7.2.1. Síntese de 4-amidino-5-aminoimidazoles

4-(imino(tiomorfolino)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina - 59c



A uma suspensão amarela de 5-amino-1-fenil-1H-imidazole-4-carbimidoil cianeto **58a** (1,17 g; 5,55 mmol) em 8 mL de acetonitrilo foi adicionada tiomorfolina (2,85 mL; 5 eq.). Após a adição da amina, formou-se uma solução amarela. A mistura reacional foi colocada sob atmosfera de nitrogénio e, de seguida sob agitação magnética a 8 °C. Ao fim de 18 horas, havia um sólido rosa precipitado e o TLC (Eluente: DCM/EtOH, 9:1) revelou a ausência do reagente de partida. O balão foi colocado num banho de gelo. A suspensão foi filtrada sob vácuo e, o sólido rosa foi lavado com acetonitrilo frio. O produto foi identificado como sendo **59c** (1,20 g; 4,17 mmol; 75%), com base nos dados espectroscópicos de ¹H RMN (Tabela 3.2), ¹³C RMN (Tabela 3.2), IV (Tabela 3.2) e análise elementar (Tabela 3.1).

7.2.2. Síntese de 6-amino-9-arilpurinas

7.2.2.1. Derivados fenólicos

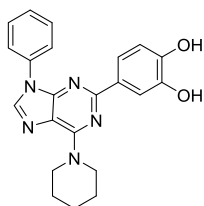
Procedimento geral

A uma suspensão de 4-amidino-5-aminoimidazole **59** em etanol foi adicionado 1,1 equivalentes de aldeído e 2 equivalentes de TFA. Após a adição do ácido, a suspensão deu origem a uma solução. Esta foi colocada sob agitação magnética à temperatura ambiente. Quando o TLC (Eluente: DCM/EtOH, 9:1), revelou ausência de reagente de partida, a solução foi concentrada até a secura. Foi adicionado DMSO e 10 equivalentes de Et₃N e, a mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 40-80 °C. A reação foi seguida por TLC e,

quando estava terminada, a solução foi concentrada quase até à secura. Foi adicionada água destilada fria à solução e, precipitou um sólido escuro. A suspensão foi filtrada e o sólido isolado foi lavado com água destilada fria. O resíduo foi recolhido e analisado por ^1H RMN. O sólido foi purificado por cromatografia em *flash* seca. O sólido foi dissolvido numa mistura de solventes THF/DCM/MeOH e aplicado na sílica. A sílica com o sólido adsorvido foi aplicada no topo de uma coluna de sílica com 2 cm de altura e foi utilizado éter etílico como eluente.

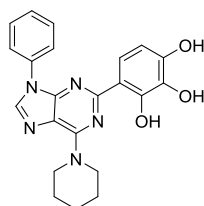
O sólido foi recolhido e identificado como 6-amino-2,9-diarilpurina **45**, após a análise dos espectros de IV (Tabela 3.5), ^1H RMN (Tabela 3.6), ^{13}C RMN (Tabela 3.7) e análise elementar (Tabela 3.4).

4-(9-fenil-6-(piperidin-1-il)-9H-purin-2-il)benzene-1,2-diol – **45d**



O resíduo do composto **45d** (0,26 g) foi obtido como um sólido castanho a partir do 4-(imino(piperidin-1-il)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59a** (0,20 g; 0,74 mmol) por reação com o 3,4-dihidroxibenzaldeído (0,12 g; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (110 μL ; 2,0 eq.) durante 1 dia à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,25 mL de DMSO e Et_3N (1,04 mL; 10 eq.) durante 2 dias a 80 °C e 7 dias a 40 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 150 mL de éter etílico como eluente, para obter a purina **45d** (0,11 g; 0,28 mmol; 38%) como um sólido amarelo claro.

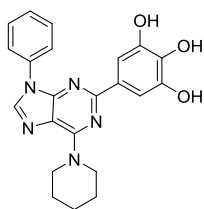
4-(9-fenil-6-(piperidin-1-il)-9H-purin-2-il)benzene-1,2,3-triol – **45e**



O resíduo do composto **45e** (0,29 g) foi obtido como um sólido negro a partir do 4-(imino(piperidin-1-il)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59a** (0,21 g; 0,77 mmol) por reação com o 2,3,4-trihidroxibenzaldeído (0,13 g; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (113 μL ; 2,0 eq.) durante 12 dias à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,20 mL de DMSO e Et_3N (1,08 mL; 10

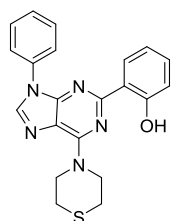
eq.) durante 18 horas a 80 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 150 mL de éter etílico como eluente. A purina **45e** (0,032 g; 0,079 mmol; 10%) foi isolada como um sólido bege.

5-(9-fenil-6-(piperidin-1-il)-9H-purin-2-il)benzene-1,2,3-triol - 45f

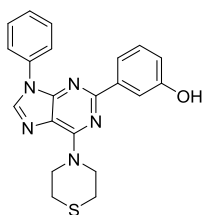


O resíduo do composto **45f** (0,29 g) foi obtido como um sólido castanho a partir do 4-(imino(piperidin-1-il)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59a** (0,20 g; 0,76 mmol) por reação com o 3,4,5-trihidroxibenzaldeído (0,15 g; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (112 µL; 2,0 eq.) durante 5 dias à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,20 mL de DMSO e Et₃N (1,06 mL; 10 eq.) durante 1 dia a 80 °C e 18 horas a 60 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 350 mL de éter etílico como eluente, para obter a purina **45f** (0,13 g; 0,32 mmol; 42%) como um sólido bege.

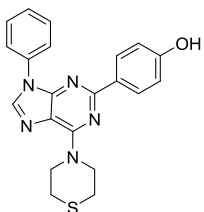
2-(9-fenil-6-tiomorfolino-9H-purin-2-il)fenol - 45m



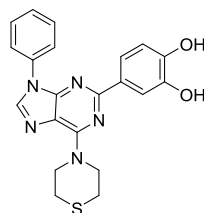
O resíduo do composto **45m** (0,26 g) foi obtido como um sólido rosa a partir do 4-(imino(tiomorfolino)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59c** (0,20 g; 0,70 mmol) por reação com o 2-hidroxibenzaldeído (84 µL; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (104 µL; 2,0 eq.) durante 18 horas à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,20 mL de DMSO e Et₃N (0,98 mL; 10 eq.) durante 2 dias a 80 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 150 mL de éter etílico como eluente, tendo-se obtido a purina **45m** (0,043 g; 0,11 mmol; 16 %) como um sólido branco.

3-(9-fenil-6-tiomorfolino-9H-purin-2-il)fenol – 45n

O resíduo do composto **45n** (0,27 g) foi obtido como um sólido rosa a partir do 4-(imino(tiomorfolino)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59c** (0,20 g; 0,71 mmol) por reação com o 3-hidroxibenzaldeído (0,099 g; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (106 μ L; 2,0 eq.) durante 18 horas à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,20 mL de DMSO e Et₃N (1 mL; 10 eq.) durante 2 dias a 80 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 150 mL de éter etílico como eluente. A purina **45n** (0,13 g; 0,33 mmol; 46%) foi isolada como um sólido amarelo.

4-(9-fenil-6-tiomorfolino-9H-purin-2-il)fenol – 45o

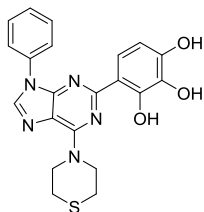
O resíduo do composto **45o** (0,29 g) foi obtido como um sólido laranja a partir do 4-(imino(tiomorfolino)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59c** (0,22 g; 0,76 mmol) por reação com o 4-hidroxibenzaldeído (0,10 g; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (113 μ L; 2,0 eq.) durante 18 horas à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,20 mL de DMSO e Et₃N (1,07 mL; 10 eq.) durante 2 dias a 80 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 200 mL de éter etílico como eluente, para obter a purina **45o** (0,11 g; 0,28 mmol; 37%) como um sólido bege.

4-(9-fenil-6-tiomorfolino-9H-purin-2-il)benzene-1,2-diol – 45p

O resíduo do composto **45p** (0,24 g) foi obtido como um sólido castanho a partir do 4-(imino(tiomorfolino)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59c** (0,21 g; 0,73 mmol) por reação com o 3,4-dihidroxibenzaldeído (0,11 g; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (108 μ L; 2,0 eq.) durante 1 dia à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,20 mL de DMSO e Et₃N (1,02 mL; 10 eq.)

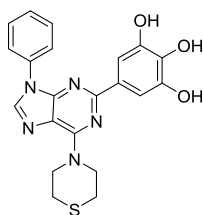
durante 1 dia a 80 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 400 mL de éter etílico como eluente. A purina **45p** (0,065 g; 0,16 mmol; 22%) foi isolada como um sólido branco.

4-(9-fenil-6-tiomorfolino-9H-purin-2-il)benzene-1,2,3-triol - 45q



O resíduo do composto **45q** (0,25 g) foi obtido como um sólido castanho a partir do 4-(imino(tiomorfolino)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59c** (0,21 g; 0,73 mmol) por reação com o 2,3,4-trihidroxibenzaldeído (0,13 g; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (108 µL; 2,0 eq.) durante 1 dia à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,20 mL de DMSO e Et₃N (1,02 mL; 10 eq.) durante 1 dia a 80 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 300 mL de éter etílico como eluente, tendo-se obtido a purina **45q** (0,015 g; 0,036 mmol; 5%) como um sólido bege.

5-(9-fenil-6-tiomorfolino-9H-purin-2-il)benzene-1,2,3-triol - 45r



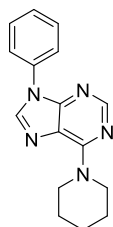
O resíduo do composto **45r** (0,26 g) foi obtido como um sólido castanho a partir do 4-(imino(tiomorfolino)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59c** (0,20 g; 0,71 mmol) por reação com o 3,4,5-trihidroxibenzaldeído (0,14 g; 1,1 eq.) em 1) 0,5 mL de etanol e TFA (105 µL; 2,0 eq.) durante 5 dias à temperatura ambiente. Seguindo-se 2) 0,20 mL de DMSO e Et₃N (1 mL; 10 eq.) durante 1 dia a 80 °C e 18 horas a 60 °C. O resíduo foi purificado por cromatografia em *flash* seca usando 400 mL de éter etílico como eluente, A purina **45r** (0,019 g; 0,045 mmol; 6%) foi isolada como um sólido branco.

7.2.2.2. Derivados não fenólicos

Procedimento geral

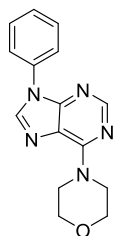
A uma suspensão de 4-amidino-5-aminoimidazole **59** em acetonitrilo foi adicionado 2 equivalentes de *N,N*-dimetilformamida dietil acetal sob agitação magnética à temperatura ambiente. A reação foi seguida por TLC (Eluente: DCM/EtOH, 9:1) e quando este revelou a ausência do reagente limitante, a mistura reacional foi concentrada até à secura. O resíduo foi dissolvido em THF e a solução foi filtrada numa coluna de sílica com 0,5 cm de altura. A sílica foi lavada com éter etílico (100 mL) e, a solução resultante foi concentrada e arrefecida num banho de gelo. Adicionou-se umas gotas de éter etílico e *N*-hexano frios. A suspensão resultante foi filtrada e, o sólido lavado com éter etílico e *N*-hexano frios. O sólido foi recolhido e identificado como 6-amino-9-arilpurina **62**, após a análise dos espectros de IV (Tabela 3.5), ¹H RMN (Tabela 3.6), ¹³C RMN (Tabela 3.7) e análise elementar (Tabela 3.4).

9-fenil-6-(piperidin-1-il)-9*H*-purina – 62a



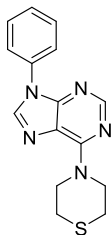
O composto **62a** (0,14 g; 0,50 mmol; 67%) foi obtido como um sólido rosa claro a partir do 4-(imino(piperidin-1-il)metil)-1-fenil-1*H*-imidazole-5-amina **59a** (0,20 g; 0,75 mmol) com *N,N*-dimetilformamida dietil acetal (258 µL; 2,0 eq.) em 5 mL de acetonitrilo durante 1 dia, sob agitação magnética.

4-(9-fenil-9*H*-purin-6-il)morfolina – 62b



O composto **62b** (0,18 g; 0,65 mmol; 81%) foi obtido como um sólido branco a partir do 4-(imino(morfolino)metil)-1-fenil-1*H*-imidazole-5-amina **59b** (0,22 g; 0,80 mmol) com *N,N*-dimetilformamida dietil acetal (274 µL; 2,0 eq.) em 5 mL de acetonitrilo durante 2 dias, sob agitação magnética.

4-(9-fenil-9H-purin-6-il)tiomorfolina - 62c



O composto **62c** (0,13 g; 0,44 mmol; 81%) foi obtido como um sólido rosa claro a partir do 4-(imino(tiomorfolino)metil)-1-fenil-1H-imidazole-5-amina **59c** (0,16 g; 0,54 mmol) com *N,N*-dimetilformamida dietil acetal (185 μ L; 2,0 eq.) em 5 mL de acetonitrilo durante 9 dias, sob agitação magnética.

7.3. Procedimento experimental para a avaliação da atividade antifúngica dos compostos

A atividade antifúngica dos compostos **45a-p** e **62a-c** foi determinada em *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 e *Candida albicans* SC 5314, recorrendo à técnica de microdiluição descrita no M27-A3 editado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).¹

Os valores da concentração mínima inibitória (MIC) foram determinados recorrendo ao método de turbidimetria. Este método baseia-se na medição da luz absorvida/dispersa por uma suspensão celular homogénea, em função do aumento da biomassa. Os valores de MIC foram definidos como a concentração mais baixa de composto que origina uma inibição maior ou igual a 80% do crescimento celular quando comparada com o crescimento na ausência de composto.

7.3.1. Preparação das soluções dos compostos

As soluções *stock* dos compostos (40 mM) foram preparadas em DMSO. Posteriormente, com o intuito de obter soluções de concentração duas vezes superior à pretendida, as soluções *stock* foram diluídas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido 3-(*N*-morfolino)-propanossulfónico - MOPS (ForMedium). As concentrações finais dos compostos testadas variaram entre 50 nM e 400 μ M e, a concentração final de DMSO foi de 1% (v/v).

7.3.2. Determinação da atividade antifúngica dos compostos

Em todos os ensaios, com o intuito de obter uma cultura jovem, as células de levedura cresceram em placas com meio YEPDA (2% de glucose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura e 2% de agar) durante 48 horas a 30 °C. Decorrido este tempo, foi transferida uma parte do inóculo proveniente da cultura para 5 mL de solução salina 0,85% de modo a obter uma densidade celular de $4,5 \times 10^6$ células/mL. De seguida, foram realizadas duas diluições em série 1:50 e 1:20 com meio RPMI-1640 para se obter uma suspensão celular com uma densidade de $4,5 \times 10^3$ células/mL. Foi utilizada uma microplaca de 96 poços de fundo redondo (JetBiofil) e, em cada poço foi adicionado 100 µL da suspensão celular previamente preparada e 100 µL da solução do composto em estudo (preparada como descrito em 7.3.1). A densidade celular em cada poço foi $2,25 \times 10^3$ células/mL. As placas foram incubadas durante 48 horas a 30 °C, sem agitação. Os valores de MIC foram determinados pela leitura da turbidez de cada poço pelo método visual e espectrofotometricamente a 640 nm com um leitor de microplacas automático (Molecular Devices SpectraMax Plus).

Todas as concentrações dos compostos em estudo foram testadas em triplicado. Os antifúngicos fluconazole e flucitosina foram utilizados como referência.

Adicionalmente, foram realizados controlos de esterilidade (brancos) e controlos de crescimento com 1% de DMSO. Com o intuito de determinar a absorvância dos compostos no meio de cultura, foram realizados controlos contendo apenas meio de cultura e os compostos às concentrações finais testadas. Foram realizados pelo menos 3 ensaios independentes.

7.3.3. Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar o efeito letal (por oposição a inibição de crescimento) dos compostos em estudo recorreu-se ao método das diluições seriadas. Com base neste método, é possível obter uma estimativa do número de células viáveis existentes em cada poço. Assim, a partir das amostras de cada poço foram realizadas cinco diluições em série 1:10. Posteriormente, 5 µL de cada diluição

foram colocados em placas com meio YEPDA. Após 48 horas a 30 °C, as placas foram fotografadas com o ChemiDoc XRS (BioRad). Como padrão foram utilizados os poços controlo que não continham os compostos em estudo.

Adicionalmente, para o composto **45e**, a viabilidade celular foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs). Assim, a partir dos poços contendo o composto **45e**, foram realizadas quatro diluições em série 1:10. Das duas últimas diluições foram adicionadas várias gotas de 40 µL a placas com meio YEPDA que, posteriormente foram incubadas a 30 °C durante 48 horas. Decorrido este tempo, a percentagem de células viáveis foi determinada, considerando 100% de crescimento o número de UFCs obtidas no controlo sem composto.

7.4. Rastreio fármaco-genómico de uma coleção de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* da Euroscarf

Para tentar identificar os genes potencialmente envolvidos nos processos de sensibilidade/resistência de *Saccharomyces cerevisiae* ao composto **45f**, realizou-se um rastreio fármaco-genómico com uma coleção de mutantes da Euroscarf. De acordo com a figura 7.1, os mutantes da coleção da Euroscarf foram transferidos usando um replicador de 96 pinos para *omnitrays* (Thermo Scientific) com meio YEPDA. Após 72 horas a 30 °C, os mutantes foram transferidos usando o replicador para placas de 96 poços de fundo liso (Orange Scientific) contendo 150 µL de meio RPMI-1640 suplementado com aminoácidos (2g/L) (ForMedium e Sigma-Aldrich), adenina (0,5g/L) (ForMedium), uracilo (2g/L) (ForMedium), inositol (2g/L) (Duchefa Biochemie) e ácido 4-aminobenzoico (0,2g/L) (Sigma-Aldrich) e, foram incubados durante 24 horas a 30 °C (sem agitação). Decorrido esse tempo, o crescimento celular foi avaliado pela medida da DO a 640 nm, com um leitor de microplacas automático (Molecular Devices SpectraMax Plus). Posteriormente, de cada um dos inóculos foi retirado 2 µL com uma pipeta multicanal para placas de 96 poços de fundo redondo, contendo 150 µL de uma solução do composto **45f** em meio RPMI-

1640 suplementado. A concentração final do composto **45f** foi 50 μ M com 1% de DMSO. As células foram incubadas 48 h a 30 °C, sem agitação, e o crescimento celular foi avaliado pela DO a 640 nm, com um leitor de microplacas automático.

A DO atingida pelos mutantes foi comparada com a DO da estirpe parental (BY4741) e, o tratamento dos resultados baseou-se na aplicação sucessiva de dois critérios distintos.

No primeiro critério, os mutantes que apresentaram um valor de DO igual ou inferior a metade da DO obtida para a estirpe parental ($DO \leq 0,1$) foram considerados sensíveis. Por outro lado, os mutantes que apresentaram um valor de DO igual ou superior ao dobro do valor obtido para o crescimento da estirpe parental ($DO \geq 0,4$) foram considerados resistentes.

No segundo critério determinou-se a razão entre a DO obtida após o tratamento em presença do composto **45f** e a DO do inóculo, sendo que estirpes com razões superiores a 70% foram consideradas resistentes e, estirpes com razões inferiores a 30% foram consideradas sensíveis. Este critério permite corrigir possíveis falsos positivos ou falsos negativos em consequência de diferenças nos inóculos.

A identificação das estirpes resistentes e sensíveis ao composto **45f** baseou-se na junção dos dois critérios acima descritos. Estirpes com razões superiores a 70% e com DO após tratamento superiores a 0,4 foram consideradas resistentes. Estirpes com razões inferiores a 30% e com DO após tratamento inferiores a 0,1 foram consideradas sensíveis.

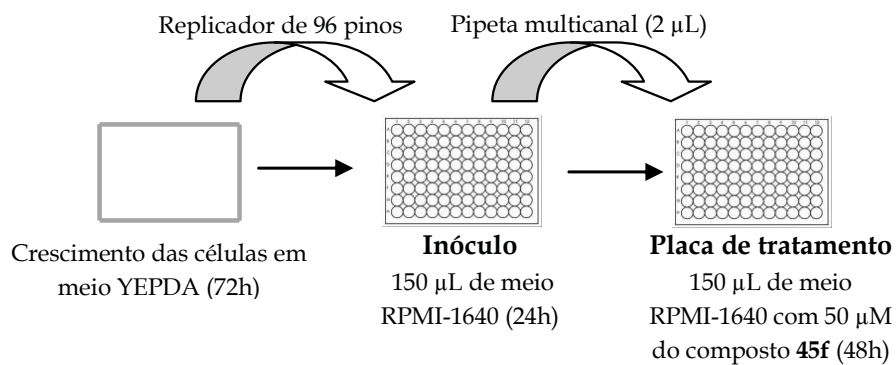


Figura 7.1. Esquema do procedimento utilizado para o rastreio fármaco-genómico com uma coleção de mutantes da Euroscarf para identificar os genes de *S. cerevisiae* envolvidos na resistência e na sensibilidade ao composto 45f.

7.5. Referências bibliográficas

- 1 CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*. 3rd edn, CLSI document M27-A3 (CLSI, USA, 2008).

